

Aus der Medizinischen Klinik und Poliklinik III  
der Ludwig-Maximilians-Universität München

Direktor: Prof. Dr. Dr. Michael von Bergwelt

**Genetische Stabilität und Prognose von AML Rezidiven am  
Klinikum Großhadern von 1999-2013**

Dissertation

zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin

an der Medizinischen Fakultät der

Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von

Daniela Schumacher

aus

Landshut

2019

**Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät**  
**der Universität München**

Berichterstatter: Prof. Dr. med. Karsten Spiekermann

Mitberichterstatter: PD Dr. Katja Anslinger  
Prof. Dr. Irmela Jeremias  
PD Dr. Christoph Walz

Mitbetreuung durch die  
promovierte Mitarbeiterin: PD Dr. med. Friederike Pastore

Dekan: Prof. Dr. med. dent. Reinhard Hickel

Tag der mündlichen Prüfung: 17.01.2019

*Für meine lieben Eltern*

## INHALTSVERZEICHNIS

<b>I.</b>	<b>EINLEITUNG .....</b>	<b>8</b>
<b>II.</b>	<b>GRUNDLAGEN DER AML .....</b>	<b>10</b>
<b>1.</b>	<b>Epidemiologie .....</b>	<b>10</b>
<b>2.</b>	<b>Diagnose .....</b>	<b>10</b>
<b>3.</b>	<b>Therapie .....</b>	<b>11</b>
3.1.	Chemotherapie .....	11
3.1.1.	Induktion .....	11
3.1.2.	Postremissionstherapie .....	12
3.2.	Stammzelltransplantation .....	13
3.2.1.	Allogene Stammzelltransplantation .....	13
3.2.2.	Autologe Stammzelltransplantation .....	13
3.3.	Komplette Remission .....	14
3.4.	Rezidivtherapie.....	14
<b>4.</b>	<b>Prognose und Genetik.....</b>	<b>15</b>
4.1.	Allgemeine Prognose .....	15
4.2.	Zytogenetik.....	16
4.2.1.	Günstige zytogenetische Aberrationen.....	16
4.2.2.	Intermediäre zytogenetische Aberrationen.....	16
4.2.3.	Ungünstige zytogenetische Aberrationen.....	17
4.3.	Molekulargenetik .....	17
4.3.1.	NPM1 .....	17
4.3.2.	FLT3-ITD.....	18
4.3.3.	FLT3-TKD .....	18
4.3.4.	MLL-PTD.....	18
<b>5.</b>	<b>Klonale Evolution.....</b>	<b>19</b>
<b>6.</b>	<b>Klassifikationen .....</b>	<b>19</b>
6.1.	FAB-Klassifikation und WHO-Klassifikation .....	19
6.2.	MRC-Klassifikation .....	21
6.3.	Breems-Score .....	22
<b>III.</b>	<b>ZIEL DER ARBEIT .....</b>	<b>23</b>

<b>IV.</b>	<b>MATERIAL UND METHODEN .....</b>	<b>24</b>
<b>1.</b>	<b>Molekulare Stabilität genetischer Marker.....</b>	<b>24</b>
1.1.	Einschlusskriterien .....	24
1.2.	Beschreibung der Datenbank .....	24
1.2.1.	Identifikation der Rezidive.....	26
1.2.2.	Erfassen der Befunde .....	26
1.2.3.	Selektion und Überprüfung der Fälle .....	27
1.2.4.	Genetische Klassifizierung und Statistische Auswertung .....	28
1.2.5.	Nachbestimmungen .....	28
<b>2.</b>	<b>Klinisches follow-up .....</b>	<b>28</b>
2.1.	Erhebung und SAP .....	28
2.2.	Auswertung mit Excel und SPSS .....	29
<b>3.</b>	<b>Definitionen.....</b>	<b>29</b>
<b>V.</b>	<b>ERGEBNISSE .....</b>	<b>30</b>
<b>1.</b>	<b>Patientenselektion.....</b>	<b>30</b>
<b>2.</b>	<b>Kollektiv mit vollständigen Angaben zur Rezidivtherapie (n=135) ....</b>	<b>31</b>
2.1.	Patientencharakteristika Übersicht n=135.....	31
2.2.	Initiale Behandlung .....	33
2.3.	Rezidivfreies Überleben .....	33
2.4.	Rezidivtherapie.....	34
2.4.1.	Chemotherapie im Rezidiv .....	36
2.4.2.	KMT im Rezidiv .....	37
2.4.3.	Erfolg der Rezidivtherapie .....	38
2.4.4.	Breems-Score .....	41
2.5.	Überblick der genetischen Befunde .....	43
2.6.	Vollständige Zytogenetik .....	43
2.6.1.	Überleben nach Zytogenetik .....	46
2.7.	Fusionsgene .....	48
<b>3.</b>	<b>Kollektiv CN-AML mit <i>FLT3-ITD</i> und <i>NPM1</i>-Bestimmung n=54 .....</b>	<b>49</b>
3.1.	Stabilitäten und genetische Evolution .....	49
3.2.	NPM1/FLT3-Paare Evolution .....	50
<b>VI.</b>	<b>DISKUSSION .....</b>	<b>53</b>

---

<b>1.</b>	<b>Patientenkollektiv und Rezidivtherapie .....</b>	<b>53</b>
1.1.	Patientenkollektiv und RFS.....	53
1.2.	Rezidivtherapie und Überleben.....	54
<b>2.</b>	<b>Genetik und klonale Evolution .....</b>	<b>56</b>
2.1.	Zytogenetik.....	56
2.2.	Molekulargenetik .....	58
2.3.	Klonale Evolution .....	59
<b>VII.</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG .....</b>	<b>60</b>
<b>VIII.</b>	<b>LITERATURVERZEICHNIS .....</b>	<b>61</b>
<b>IX.</b>	<b>ANHANG .....</b>	<b>72</b>
<b>X.</b>	<b>ABBILDUNGS- UND TABELLENVERZEICHNIS.....</b>	<b>73</b>
<b>XI.</b>	<b>DANKSAGUNG .....</b>	<b>75</b>

**ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS**

allo	allogen
AML	akute myeloische Leukämie
ATRA	All-trans-Retinoinsäure
ATO	Arsentrioxid
CBF	core binding factor
CEBPA	CCAT/enhancer-binding protein alpha
CN-AML	akute myeloische Leukämie mit normalem Karyotyp
CR	komplette Remission
CRc	zytogenetische Remission
CRI	inkomplette Remission
DFS	disease free survival
DLI	donor lymphocyte infusion
ECOG	performance status der Eastern Cooperative Oncology Group
ED	Erstdiagnose
ELN	European Leukemia Network
ETO	eight-twenty one oncoprotein
FAB	French American British Classification
FACS	fluorescence activated cell sorting
FISH	Fluoreszenz-in-situ hybridisierung
FLT3	fms like tyrosine kinase 3
GH	Klinikum Großhadern
GvL	Graft versus Leukemia Effekt
HLA	human leukocyte antigen
HMA	hypomethylierende Substanzen
ITD	internal tandem duplication
KMT	Knochenmarktransplantation
KOF	Körperoberfläche
LDH	Laktatdehydrogenase
LfL	Datenbank des Labors für Leukämiediagnostik
MDS	myelodysplastisches Syndrom
MLL	mixed lineage leukemia gene-
NPM1	Nucleophosmin 1
OS	overall survival
PBSCT	peripher blood stem cell transplantation
PCR	Polymerasekettenreaktion
PTD	partial tandem duplication
PML	Promyelozytenleukämie Gen
RFS	relapse free survival
RUNX	runt related transcription factor
sAML	sekundäre AML
SCT	stem cell transplantation
t-AML	therapieassoziierte AML
TBI	total body irradiation
TKD	tyrosin kinase domain
WHO	World Health Organisation

## **I. EINLEITUNG**

Maligne Neoplasien stellen die zweithäufigste Todesursache in der westlichen Welt dar. [1] Daher versucht die Forschung seit vielen Jahren die Pathogenese und molekularen Grundlagen dieser Erkrankungen zu ergründen. Albert Knudson lieferte 1971 einen Ansatz dafür, welche Art von genetischen Veränderungen der Entstehung von Krebs zu Grunde liegen könnte. In seiner Two-Hit Hypothese äußerte er, am Beispiel des Retinoblastoms, die Vermutung, dass zwei Mutationen nötig sind um die Erkrankung auszulösen, eine sogenannte Klasse 1 Mutation, die eine proliferative Wirkung auf die Zelle hat und eine Klasse 2 Mutation, die eine hemmende Auswirkung auf die Tumorsuppression der Zelle hat. [2] Auch für die AML wurden entsprechende Mutationen gefunden, allerdings nur bei einer geringen Anzahl von Patienten, weshalb hier nach alternativen Entstehungsmechanismen geforscht wird. [3] So geht man nun von einer multiple-hit-Hypothese aus, das heißt, dass mehr als zwei Mutationen in verschiedenen Genen nötig sind, die zur Entstehung der Erkrankung essentiell sind. Für die AML wurde in den letzten Jahren eine Vielzahl zytogenetischer und molekulargenetischer Veränderungen gefunden, die eine entscheidende Rolle bei der Entartung der myeloischen Zellen spielen. In diesem Zusammenhang geht man davon aus, dass eine einzelne Zelle, die sogenannte Krebs-Stammzelle, den Ursprung der Erkrankung bildet und im Laufe der Zeit weitere Mutationen erworben werden, die Überlebensvorteile gegenüber anderen Zellen bieten, oder die die Entwicklung von Therapieresistenzen fördern. Diese Entwicklung wird auch klonale Evolution genannt. [4] Nicht nur bei der primären Entstehung der Erkrankung, sondern auch bei der Entwicklung eines Rezidivs wurde dieses Phänomen als bedeutender Faktor identifiziert. Hier lassen neue Forschungsergebnisse vermuten, dass ein Wiederauftauchen eines Klons der ursprünglichen Krebs-Stammzelle, oder eine Evolution dieses Klons für das Auftreten von Rezidiven verantwortlich ist. [5] Um hier die entscheidenden Mutationen zu finden ist es erforderlich das genetische Profil zum Zeitpunkt der Erstdiagnose und im Rezidiv zu vergleichen und hier die klonale Evolution, die die Zellen bei der Entstehung eines Rezidivs durchlaufen, näher zu betrachten. [6] Des Weiteren stellt sich die Frage, welche prognostischen Unterschiede sich durch unterschiedliche Mutationsprofile für den individuellen Erkrankungsfall



ergeben und welche Mutationen auch in Zukunft in den Fokus der Forschung, bei der Entwicklung von Therapien mit spezifischen genetischen Angriffspunkten, rücken sollten. [7] Aus diesem Grund beschäftigt sich die Arbeit im Folgenden mit dem Vergleich der Stabilitäten ausgewählter molekulargenetischer Mutationen, sowie der Evolution zytogenetischer Aberrationen von AML-Erkrankungen in Erstdiagnose und Rezidiv in 141 Fällen, sowie deren prognostischen Bedeutung.

## **II. GRUNDLAGEN DER AML**

### **1. Epidemiologie**

Die AML stellt die häufigste akute Leukämie im Erwachsenenalter dar [8] und ist mit einer Inzidenz von ca. 4 zu 100.000 eine bedeutende Erkrankung der Hämato-Onkologie. [9] Bei der Inzidenz unter den verschiedenen Krebsarten nahmen die Leukämien bei Männern mit 3% im Jahr 2012 den 9ten Platz ein und lagen bei der Zahl der Todesfälle durch maligne Grunderkrankungen für beide Geschlechter mit jeweils 4% auf Platz 6. [10] Das mittlere Erkrankungsalter liegt bei ca. 70 Jahren. [11]

### **2. Diagnose**

Die AML stellt eine heterogene Erkrankung dar, der verschiedene genetische Veränderungen auf Ebene der hämatologischen Vorläuferzellen zu Grunde liegen können. Genauso variabel ist die Klinik mit der sich die Patienten präsentieren. Der Goldstandard für die Diagnose ist nach wie vor die Knochenmarkspunktion mit Nachweis von 20% blastären Zellen im Aspirat, aber auch eine Diagnose mit Nachweis von Blasten im peripheren Blut, ohne Knochenmarksnachweis ist möglich. Für die Patienten mit einer „punctio sicca“ kommt auch eine Knochenmarksbiopsie in Frage. Ausnahmen für die 20% Grenze stellen Leukämien mit den genetischen Aberrationen t(15;17), t(8;21), inv(16) oder t(16;16) (siehe II/4), sowie bestimmte Erythroleukämien dar. Die Proben werden als Knochenmarksausstriche in einer May-Grünwald-Giemsa- oder Wright-Giemsa-Färbung beurteilt. Bei der Zahl der Blasten werden Myeloblasten, Monoblasten und Megakaryoblasten miteinbezogen, während Erythroblasten mit Ausnahme der Erythroleukämie nicht hinzugerechnet werden. [12] Die Einteilung der AML-Untergruppen geschieht durch Beurteilung der Morphologie und Zellularität, sowie Zytochemie und immunologischen Eigenschaften der gefundenen Blasten. Hierfür wird die FAB-Klassifikation verwendet, die die AML in acht Untergruppen nach den genannten Kriterien einteilt. (siehe II/6) [13] Diese Kriterien wurden von der WHO überarbeitet und beziehen neben den zellulären Eigenschaften auch genetische Charakteristika in die Klassifizierung mit ein. [14] Des Weiteren ist es wichtig zu unterscheiden, ob es sich bei der

Erkrankung um eine de novo AML, sekundäre AML (sAML) oder therapieassoziierte AML (t-AML) handelt, wobei die de novo AML definiert wird, als neu aufgetretene AML bei der es in der klinischen Vorgeschichte keine Zeichen eines MDS oder einer anderen myeloproliferativen Abnormalität gab (sAML), bzw. kein Nachweis für eine Exposition gegenüber Leukämie-assoziierten Behandlungen (t-AML) vorliegt. [13]

### **3. Therapie**

Die Therapieschemata richten sich vornehmlich nach dem Alter der Patienten. So gelten verschiedene Leitlinien für Patientengruppen zwischen 18 und 60 Jahren, zwischen 60 und 75 Jahren und welchen, die älter sind als 75 Jahre. Des Weiteren werden die Herkunft und das genetische Profil der AML in die Therapieentscheidung miteinbezogen. [12] Ziel der Therapie ist das Erreichen einer kompletten Remission (CR) und nachfolgender Sicherung des krankheitsfreien Überlebens (disease free survival/DFS). [15]

#### **3.1. Chemotherapie**

##### **3.1.1. Induktion**

Für die jüngere Patientengruppe ist das „7+3“ Schema bestehend aus Cytarabin für 7 Tage, gefolgt von einem Anthrazyklin für 3 Tage die Standardtherapie. Hierdurch können CR-Raten von 70 bis 80% erreicht werden. [16] Eine Alternative hierzu stellt die Verabreichung von Hochdosis-Cytarabin alle 12 Stunden für 6 Tage gefolgt von einem Anthrazyklin für 3 Tage dar, was allerdings bisher nicht außerhalb von klinischen Studien zum Einsatz kommt. Des Weiteren ist vor allem die jüngere Patientenkohorte oft in Studien eingebunden und erhält hier entsprechende alternative Regime. Ebenfalls möglich ist eine allogene PBSCT bei geeignetem Spender „upfront“, ohne vorhergehende Chemotherapie, oder nach „bridging“, einer bis zur Transplantation überbrückenden Chemotherapie, meist bestehend aus Cytarabin, durchzuführen (siehe II/3.2). [17]

Eine Ausnahme stellt die Promyelozytenleukämie dar. Hier kommt aufgrund des sehr guten Ansprechens eine Kombination von all-trans-Retinoinsäure (ATRA) oder Arsentrioxid (ATO) und einem Anthrazyklin zum Einsatz. [18]

Für ältere Patienten bis 74, mit gutem Allgemeinzustand und fehlenden

Komorbiditäten kann ebenfalls die Standardtherapie verwendet werden. Hier konnte gezeigt werden, dass bei Verwendung von Daunorubicin als Anthrazyklin eine Dosiserhöhung bei Patienten bis 65 sogar Vorteile bringt. Ansonsten ist darauf zu achten, dass die Wahl der unterschiedlichen Chemotherapeutika sich bei älteren Patienten nach der individuellen Komorbidität und der Toxizität des Mittels zu richten hat. [12]

Patienten über 75 Jahre können von einer abgewandelten Standardtherapie profitieren. Hierbei zeigen vor allem günstige *CBF*-AML's und *CN*-AML's mit *NPM1* Mutation ein gutes Ansprechen auf das „7+3“ Schema. Für die anderen Patienten mit schlechtem Allgemeinzustand oder Komorbiditäten steht eine Therapie mit niedrig dosiertem Cytarabin oder mit hypomethylierenden Substanzen (HMA) zur Verfügung, allerdings ist die Gesamtprognose hier eher schlecht. [12]

### **3.1.2. Postremissionstherapie**

Für die Wahl der Konsolidierungstherapie ist das genetische Profil der Patienten entscheidend. Wurde die AML nach ELN-Klassifikation als günstig eingestuft, so gilt eine Behandlung mit 4 Zyklen Hochdosis-Cytarabin als Standardtherapie. Eine allogene Stammzelltransplantation wird erst im Rezidiv durchgeführt. Für Patienten mit intermediärem Risiko werden ebenfalls 3 bis 4 Zyklen Hochdosis-Cytarabin eingesetzt, allerdings kommt für diese Patientengruppe auch eine allogene Stammzelltransplantation in Frage. Auch hier ist das genetische Profil entscheidend. Fehlen günstige Mutationen, wie *NPM1* und *CEBPA* oder existieren *FLT3-ITD* Mutationen (siehe II/4.3.), ist eine Transplantation von Vorteil. Wurde für Patienten aufgrund des genetischen Profils ein hohes Risiko ermittelt, so wird hier eine allogene Stammzelltransplantation in 1.CR als Mittel der Wahl empfohlen, da sie deutlich bessere Ergebnisse als eine Chemotherapie zeigt. [12]

Für die Patientengruppe von 60-74 Jahren liegen unterschiedliche Studien vor, die am ehesten für eine Konsolidierung mit mehreren Zyklen einer hoch dosierten Chemotherapie mit Cytarabin sprechen. Bei Patienten mit intermediärem oder ungünstigem Risikoprofil sollte die Möglichkeit einer allogenen Stammzelltransplantation geprüft werden. [11]

### **3.2. Stammzelltransplantation**

#### **3.2.1. Allogene Stammzelltransplantation**

Bei der allogenen Stammzelltransplantation werden Stammzellen eines Spenders dem Patienten nach myeloablativer Therapie verabreicht und so versucht das erkrankte blutbildende System zu ersetzen. Zudem kommt es zu einem immuntherapeutischen Effekt, dem Graft versus Leukemia (GvL) Effekt, bei dem die Stammzellen des Spenders die körpereigenen Zellen als Fremd erkennen und beginnen diese zu bekämpfen und sich so auch gegen verbliebene Tumorzellen richten. [19] Hierbei können sowohl direkt Zellen aus dem Knochenmark entnommen werden, als auch nach Stimulation des Spenders, dessen Stammzellen aus dem peripheren Blut filtriert und dem Spender infundiert werden. Hierbei zeigt die periphere Blutstammzelltransplantation bessere Ergebnisse in der Regeneration der Blutbildung nach der Transplantation, sowie kürzere Liegezeiten im Krankenhaus, jedoch keine Unterschiede für das Risiko eines Rezidivs. [20] Für die myeloablative Therapie werden verschiedene Regime eingesetzt, die entweder mit oder ohne Ganzkörperbestrahlung (total body irradiation/TBI) mit 4Gy, sowie mit verschiedenen Agenzien (z.B. Cyclophosphamid, oder Melpahalan plus Buslufan) durchgeführt wird. [21, 22] Bei der Wahl der Spender sind HLA-idente Geschwister oder 10/10 gematchte Fremdspender die beste Option, da hier die Transplantationen die besten 3-Jahres-Überlebensraten aufzeigen. [23]

Die allogene Stammzelltransplantation stellt eine gute Alternative für die Konsolidierungstherapie bei Patienten mit intermediärer oder schlechter zytogenetischer Konstellation dar. Hier wurden signifikante Vorteile für RFS und OS gefunden. Nicht so bei Patienten mit günstiger Zytogenetik, hier ist nach wie vor die Chemotherapie Mittel der Wahl. [24, 25] Auch für Patienten mit primär refraktärer und rezidivierter AML ist die allogene Stammzelltransplantation eine wichtige Therapieoption, die hier bessere Ergebnisse als eine Chemotherapie zeigt. [26]

#### **3.2.2. Autologe Stammzelltransplantation**

Die autologe Stammzelltransplantation stellt eine alternative Möglichkeit der Konsolidierungstherapie in Kombination mit einer Chemotherapie dar. Hierbei wird nach den ersten Zyklen der Chemotherapie Knochenmark des Patienten

entnommen und aufbewahrt und nach einer myeloablativen Therapie der Patienten (z.B. mit Cyclophosphamid und TBI) ihm wieder zugeführt. Es konnte gezeigt werden, dass dadurch ein längeres Rezidiv freies Überleben erreicht werden konnte [27], während insgesamt allerdings nicht so gute Ergebnisse wie mit einer allogenen Stammzelltransplantation erreicht werden können. [28]

### 3.3. **Komplette Remission**

Das Erreichen einer CR ist essentiell für den Erfolg der Therapie und der Chance auf Heilung. Die Bestätigung erfolgt mittels Knochenmarkspunktion, sowie peripherer Blutentnahme. Eine morphologische CR ist definiert als weniger als 5% Blasten im Knochenmark, bei erfolgreicher Materialgewinnung mit mindestens 200 kernhaltigen Zellen, kombiniert mit einer Zahl von neutrophilen Granulozyten von über 1G/l, sowie über 100G/l an Thrombozyten. Wurden die Kriterien im Knochenmark erfüllt, während einer der Parameter im peripheren Blut nicht übereinstimmt, so spricht man von einer inkompletten Remission (CRi). Da die Genetik eine entscheidende Rolle für den weiteren Verlauf der Erkrankung spielt, wurden hier weitere Remissionskriterien definiert. Unter zytogenetischer Remission (CRc) versteht man die Rückkehr zum normalen Karyotyp bei Beurteilung von mindestens 20 Metaphasen, falls bei ED Aberrationen festgestellt wurden, wobei gleichzeitig die morphologischen CR Kriterien ebenfalls erfüllt sein müssen. Ähnlich verhält es sich bei der molekulargenetischen Remission. Hier werden, neben der morphologischen CR, mittels PCR bestimmte vorher bestehende Marker (z.B. *AML1/ETO*, *PML-RARA*) nachgewiesen, um ein Residuum auszuschließen. [12, 13]

### 3.4. **Rezidivtherapie**

Trotz guter Remissionsraten nach erster Therapie kommt es bei 75-80% der Patienten zu einem unzureichenden Ansprechen, oder zu einem Rezidiv der AML, was mit einer schlechten Prognose einhergeht. [29, 30] Dementsprechend intensiv muss eine Rezidivtherapie durchgeführt werden, um eine Heilung erzielen zu können. Es stehen verschiedene Optionen zur Verfügung. Zur Reinduktion kann eine Chemotherapie durchgeführt werden, sowie auch upfront eine allogene Stammzelltransplantation, aber auch neue Therapien im Rahmen von Studien, oder nur palliative Therapie kommen in Frage. Eine Reinduktionstherapie mit dem Ziel einer 2.CR beruht meist auf Basis von Cytarabin in intermediärer

oder hoher Dosis. Bei Erreichen einer 2.CR ist aber auch hier die allogene Stammzelltransplantation die Konsolidierungstherapie der Wahl, da sie der alleinigen Chemotherapie im Outcome deutlich überlegen ist. Bei der Wahl der Spender sind hier nicht nur HLA-idente Geschwister eine Option, sondern auch Fremdspender, sowie HLA-mismatch und haploidente Spender kommen in Frage, da die Prognose ohne Transplantation sehr viel schlechter wäre. Neue Therapien und Agenzien beinhalten unter anderem monoklonale Antikörper (z.B. Gemtuzumab), oder Nukleosid Analoga (z.B. Clofarabin) und werden im Rahmen von Studien untersucht. Bei extrem schlechter Prognose und schlechtem Allgemeinzustand der Patienten ist oft nur noch ein palliativer Ansatz möglich. [12, 26]

## **4. Prognose und Genetik**

### **4.1. Allgemeine Prognose**

Allgemein erreichen ca. 60-80% der jüngeren Patienten eine komplette Remission nach der Standardtherapie, aber nur bei 20-30% kann auch danach ein DFS gesichert werden. Bei älteren Patienten über 60 ist die Prognose deutlich schlechter. Nur 40-55% dieser Altersgruppe können eine CR erreichen mit entsprechend schlechter Langzeitprognose. [31] Allerdings spielt die Genetik der individuellen AML und hierbei vor allem die Zytogenetik die entscheidende Rolle für die Prognose der Erkrankung. [13] Nicht AML bezogene Faktoren sind vor allem Alter und Allgemeinzustand der Patienten und können ein Faktor für das Ansprechen auf die Induktionstherapie sein. [32] Dennoch sind die Charakteristika der AML und ihr genetisches Profil der wichtigste Faktor für die Prognose der AML. Die Vielfalt der Mutationen und Aberrationen wurden vielfach analysiert und in verschiedene Risikogruppen eingeteilt. Hierfür erfolgt meist eine Einteilung in günstiges, intermediäres und ungünstiges Risiko und enthält vornehmlich die Zytogenetik und je nach Klassifikationsgrundlage zusätzlich molekulargenetische Mutationen. [33-35] Verschiedene Einteilungen in die Risikogruppen nach entsprechenden Systemen sind im Kapitel „Klassifikationen“ aufgelistet. Die spezifische prognostische Bedeutung ausgewählter Aberrationen und Mutationen wird im Kapitel „Genetik“ näher betrachtet.

## 4.2. Zytogenetik

Zytogenetische Aberrationen spielen nicht nur eine Rolle für die Klassifikation der AML, sondern auch für die Prognose und Wahl der Therapie. [14, 33, 36] Ca. 60% der AML-Erkrankungen weisen bei Erstdiagnose zytogenetische Aberrationen auf, wobei t(15;17), Trisomie(8), sowie t(8;21) die häufigsten darstellen. [34] Die verschiedenen Aberrationen können gemäß ihrer Prognose in die Kategorien „Günstig/Favorable“, „Intermediär/Intermediate“ und „Ungünstig/Adverse“ eingeteilt werden (im Folgenden nach MRC-Klassifikation eingeteilt). [37]

### 4.2.1. Günstige zytogenetische Aberrationen

Die als günstig einzustufenden Aberrationen sind t(15;17), t(8;21), sowie inv(16) und können in ca. 7% der Patienten nachgewiesen werden.

Die t(8;21) wird häufig in Patienten mit M2-AML gefunden und führt zur Bildung des Fusionsgens *AML1-ETO* (alte Bezeichnung) bzw. *RUNX1-RUNX1T1* (neue Bezeichnung) und ist bei Erwachsenen mit einer guten, bei Kindern mit einer eher schlechten Prognose assoziiert.[38, 39] Bei Erwachsenen können 87% der Patienten mit der vorliegenden Mutation eine CR erreichen mit einem OS von ca. 40% nach 5 Jahren. Auch Rezidive sind bei der t(8;21) seltener zu beobachten. [37, 40]

Die t(15;17) nimmt eine Sonderstellung ein, da diese Translokation die Entstehung der akuten Promyelozyten Leukämie (M3) bedingt und durch das Vorhandensein einer spezifischen Therapie für diese Unterform der Leukämie (ATRA) eine günstige Prognose aufweist. [18, 41] Die Translokation führt zu der Entstehung des Fusionsgens *PML-RARA*, bei dem das Promyelozyten-Leukämie-Gen (*PML*) mit dem Retinoinsäure-Rezeptor-alpha (*RARA*) fusioniert, und so sensibel für die spezifische Therapie wird. [42] Dadurch konnten die Überlebensraten der Patienten die zusätzlich zur Chemotherapie mit ATRA oder ATO therapiert werden auf bis zu 70% gesteigert werden. [18, 37]

### 4.2.2. Intermediäre zytogenetische Aberrationen

Als zytogenetische Aberrationen mit intermediärer Prognose werden primär diejenigen aufgeführt, die weder zu den günstigen, noch ungünstigen gezählt werden können. Zu dieser Gruppe werden auch die normalen Karyotypen ohne Aberrationen gezählt. [34]



### 4.2.3. Ungünstige zytogenetische Aberrationen

Es wurden mehrere zytogenetische Aberrationen identifiziert, die in ihrer Prognose als ungünstig einzustufen sind und wurden entsprechend in Klassifikationssystemen (siehe II/6.2.) berücksichtigt. Erwähnenswert sind hier die komplexen Karyotypen, die definiert werden als 3 oder mehr gleichzeitig auftretende unabhängige zytogenetische Aberrationen, die mit einer schlechten Prognose einhergehen. In diesen Fällen ist darauf zu achten, dass sich bei gleichzeitigem Vorliegen einer günstigen Aberration die Zahl der Mutationen nicht auf die Prognose auswirkt und diese Fälle nach wie vor als günstig einzustufen sind. Umgekehrt verschlechtert sich die Prognose bei einer einzelnen, bereits als ungünstig einzustufenden Mutation durch das Vorliegen eines komplexen Karyotyps nicht noch zusätzlich, so dass die Anzahl der Mutationen vor allem bei den als intermediär einzustufenden Aberrationen eine Rolle spielt. [12, 34]

### 4.3. Molekulargenetik

Im Rahmen von klinischen Studien und im klinischen Alltag werden bereits einige somatische Mutationen wie *NPM1*, *FLT3-ITD* und *CEBPA* regelmäßig bestimmt. Für verschiedene Marker konnte hier bereits gezeigt werden, dass der einzelne oder kombinierte Nachweis Auswirkungen auf die Prognose, vor allem bei AML's mit normalem Karyotyp, hat. [12, 43] Im Folgenden werden die Marker vorgestellt, die im praktischen Teil der Arbeit näher betrachtet wurden.

#### 4.3.1. NPM1

Nucleophosmin 1 (*NPM1*) Mutationen werden in einer Vielzahl der AML-Fälle, vor allem bei normalem Karyotyp gefunden. [44] Des Weiteren besteht eine hohe Assoziation zu *FLT3-ITD* Mutationen. Es konnte gezeigt werden, dass *NPM1*-Mutationen mit etwas besserer Prognose bezüglich Gesamtüberleben (overall survival/OS) und krankheitsfreiem Überleben (DFS) einhergehen, als *NPM1*-Wildtyp. Auch bei gleichzeitigem Auftreten mit der als eher prognostisch ungünstig einzustufenden *FLT3-ITD*-Mutation (siehe II/4.3.2.) war ein besseres Outcome beobachtet worden, wenn auch nicht so ausgeprägt wie bei alleinigem Auftreten einer *NPM1* Mutation.[45] Die Mutation ist allerdings bei Auftreten eines Rezidivs sehr stabil und ist in annähernd allen Fällen dann auch nachweisbar. [46] Besonders günstig ist die Prognose bei Patienten, die *NPM1*

positiv, sowie *FLT3-ITD* negativ sind. [47, 48]

#### 4.3.2. FLT3-ITD

Die fms-like tyrosine kinase 3 (*FLT3*) internal tandem duplication (*ITD*) tritt mit einer Häufigkeit von 20-30% bei Erwachsenen auf und ist mit einer schlechten Prognose bezüglich OS und DFS assoziiert. [49, 50] Ebenso ist das diese Mutation mit einer kürzeren Zeit bis zum Auftreten eines Rezidivs verbunden. [51] Zusätzlich konnte gezeigt werden, dass das Rezidivrisiko und das OS weniger vor allem vom Mutationslevel der *FLT3-ITD* abhängt und ein hohes Level für das Rezidivrisiko sogar der wichtigste Prognosefaktor ist. [52] Die Mutation zeigt keine so ausgeprägte Stabilität wie *NPM1* und ist in bis zu 75% der Fälle auch im Rezidiv nachweisbar. [46, 51] Die verschiedenen Kombinationen von *NPM1* und *FLT3-ITD* bei normalem Karyotyp nehmen eine prognostische Sonderstellung ein (siehe II/3.3.1.) und können wie folgt zusammengefasst werden. *NPM1*+/*FLT3-ITD*- ist mit günstiger, *NPM1*+/*FLT3-ITD*+ mit intermediärer oder auch ungünstiger, sowie *NPM1*-/*FLT3*+ mit ungünstiger Prognose assoziiert. [52, 53]

#### 4.3.3. FLT3-TKD

Neben der Tandem Duplikation wurden im *FLT3* Gen Punktmutationen (*FLT3-TKD*) nachgewiesen die sich in ihrer Prognose von der *FLT3-ITD* unterscheiden. Es konnte eine günstigere Prognose der Punktmutation bezüglich OS und DFS gezeigt werden [54], während andere Studien darauf hinweisen, dass auch das Auftreten der *FLT3-TKD* mit einer insgesamt schlechteren Prognose einhergeht als der Wildtyp. [55, 56] Auch die Kombination der *FLT3-TKD* mit anderen Mutationen scheint eine Rolle zu spielen, da bei einem gleichzeitigen Auftreten mit *FLT3-ITD* und *MLL-PTD* ungünstige, jedoch mit *NPM1* oder *CEBPA* günstige Effekte beobachtet werden konnten. [57] So ist die Bedeutung der *FLT3-TKD* Mutation noch nicht abschließend geklärt.

#### 4.3.4. MLL-PTD

Mutationen auf dem *MLL*-Gen, das zum Teil auch *ALL-1* oder *HRX* genannt wird, werden vor allem in de novo AML's gefunden. [58] Für die *MLL* partial tandem duplication (*MLL-PTD*) konnte eine eher ungünstige Prognose, vor allem bei normalem Karyotyp, bezüglich des Rezidivrisikos und des OS gezeigt werden. [59, 60]

## 5. Klonale Evolution

Das Modell der klonalen Evolution besagt, dass eine ursprüngliche Krebs-Stammzelle, die für die Entstehung des Primärtumors verantwortlich ist im Rahmen ihres Wachstums weitere Mutationen hinzugewinnt und so die Progression des Tumors und auch Selektion eines besonders aggressiven oder auch resistenten Klons ermöglicht. Dies beruht auf einer besonderen genetischen Instabilität die die Tumorzellen auszeichnet und so diese weiteren Mutationen erst ermöglicht. [4] Diese Theorie konnte für die AML auf die Entstehung von Rezidiven erweitert werden. Es wurde herausgefunden, dass zwei Evolutionsmodelle für die Entwicklung eines Rezidivs verantwortlich sein können. Zum einen kann die ursprüngliche Krebsstammzelle weitere Mutationen hinzugewinnen, sich weiterentwickeln und so zum Rezidiv-Klon werden, zum anderen kann ein Sub-Klon der Stammzelle, der die primäre Chemotherapie überlebt hat weitere Mutationen hinzugewinnen und sich im Rezidiv ausbreiten. Hierbei konnte gezeigt werden, dass die initiale Chemotherapie es nicht nur nicht schaffte den ursprünglichen Klon komplett auszulöschen, sondern durch seine zytotoxischen Effekte wahrscheinlich auch das Muster der hinzukommenden Mutationen des Rezidiv-Klons mitbestimmt. Die inkomplette Eradikation des Ursprungs-Klons ist somit sehr viel wahrscheinlicher für die Entstehung eines Rezidivs verantwortlich, als die Entstehung eines unabhängigen sekundären Klons. Daraus könnte hervorgehen, dass eine Identifikation dieses Klons und eine gezielte auf diesen Klon ausgerichtete Therapie die Entstehung von Rezidiven entscheidend beeinflussen könnte. Diese Erkenntnisse waren möglich, indem das genetische Profil der Leukämien bei Erstdiagnose und Rezidiv näher betrachtet wurde, da das Profil des Ursprungs-Klons im Rezidiv teilweise konstant ist. [5, 6] Folglich könnte die gezielte Betrachtung der Stabilität einzelner, sowohl zytogenetischer, als auch molekulargenetischer Mutationen Hinweise darauf geben, wo die entscheidenden genetischen Veränderungen stattfinden. [61]

## 6. Klassifikationen

### 6.1. FAB-Klassifikation und WHO-Klassifikation

Die FAB-Klassifikation wurde 1976 eingeführt, um ein einheitliches Klassifizierungssystem der AML zu ermöglichen, wobei zur Einteilung morphologische und zytochemische Merkmale verwendet wurden. [62]

**Tabelle 1: FAB-Klassifikation**

<b>FAB-Typ</b>	<b>Bezeichnung</b>
M0	Akute undifferenzierte Leukämie
M1	Akute unreife Myeloblastenleukämie
M2	Akute Myeloblastenleukämie mit Ausreifung
M3	Akute Promyelozytenleukämie (APL)
M4	Akute myelomonozytäre Leukämie
M5	Akute Monoblastenleukämie
M6	Akute Erythroleukämie
M7	Akute Megakaryoblastenleukämie

Die FAB-Klassifikation diente auch als Orientierung für die Einteilung der myeloischen Neoplasien durch die WHO 2002, die im Jahr 2008 noch einmal überarbeitet wurden. Hierbei wurden nun alle zur Verfügung stehenden diagnostischen Möglichkeiten, insbesondere auch die genetischen Besonderheiten, sowie die Ätiologie der AML berücksichtigt. [14, 63]

### **WHO-Klassifikation der akuten myeloischen Leukämie**

**Tabelle 2: WHO-Klassifikation**

Akute myeloische Leukämie mit rekurrenten genetischen Aberrationen

AML mit t(8;21)(q22;q22); *RUNX1-RUNX1T1*

AML mit inv(16)(p13.1q22) or t(16;16)(p13.1;q22); *CBFB-MYH11*

APL mit t(15;17)(q22;q12); *PML-RARA*

AML mit t(9;11)(p22;q23); *MLLT3-MLL*

AML mit t(6;9)(p23;q34); *DEK-NUP214*

AML mit inv(3)(q21q26.2) oder t(3;3)(q21;q26.2); *RPNI-EVII*

AML (Megakaryoblastisch) mit (1;22)(p13;q13); *RBM15-MKL1*

AML mit Myelodysplasie-bezogenen Veränderungen

Therapie-bezogene myeloische Neoplasien

AML, ohne weitere Spezifizierung

AML mit minimaler Differenzierung

AML ohne Ausreifung  
 AML mit Ausreifung  
 Akute myelomonozytäre Leukämie  
 Akute monoblastische/monozytäre Leukämie  
 Akute erythrozytäre Leukämie  
     Pure erythrozytäre Leukämie  
     Erythroleukämie, erythrozytär/myeloisch  
 Akute megakaryoblastische Leukämie  
 Akute basophile Leukämie  
 Akute Panmyelose mit Myelofibrose

## 6.2. MRC-Klassifikation

Die MRC-Klassifikation stellt eine zytogenetische Einteilung dar, für die Prognose bezüglich Erreichen der CR, Rezidivrisiko, als auch OS unter alleiniger Berücksichtigung der Zytogenetik. [34, 37] Diese Einteilung wurde auch im Rahmen der Analysen zum Vergleich des zytogenetischen Profils bei Erstdiagnose (ED) und im Rezidiv verwendet.

**Tabelle 3: MRC-Klassifikation**

Zytogenetische Aberration
<i>Günstig</i>
t(15;17)(q22;q21)
t(8;21)(q22;q22)
inv(16)(p13q22)/t(16;16)(p13;q22)
<i>Intermediär</i>
Entitäten die weder günstig noch ungünstig klassifiziert sind
<i>Ungünstig</i>
abn(3q) [ausgenommen t(3;5)(q21~25;q31~35)]
inv(3)(q21q26)/t(3;3)(q21;q26)
add(5q), del(5q), -5
-7, add(7q)/del(7q)
t(6;11)(q27;q23)
t(10;11)(p11~13;q23)
t(11q23) [ausgenommen t(9;11)(p21~22;q23) und t(11;19)(q23;p13)]
t(9;22)(q34;q11)
-17/abn(17p)
komplex (≥ 4 nicht zusammengehörende Aberrationen)

### 6.3. Breems-Score

Zur Evaluierung des prognostischen Index zum Zeitpunkt des 1. Rezidivs wurde der Breems-Score angewendet. Bei diesem Prognose-Score werden sowohl klinische, als auch zytogenetische Faktoren berücksichtigt. [64] Für Patienten mit einem Score von 1-6 wird eine günstige, bei einem Score von 7-9 eine intermediäre, sowie von einem Score von 10-14 eine ungünstige Prognose angenommen.

**Tabelle 4: Breems-Score**

Prognosefaktor	Punkte
<i>Rezidivfreies Überleben (Intervall ab 1. Rezidiv in Monaten)</i>	
>18	0
7-18	3
≤6	5
<i>Zytogenetik bei Erstdiagnose</i>	
t(16;18) oder inv(16)	0
t(8;21)	3
andere	5
<i>Alter beim ersten Rezidiv (in Jahren)</i>	
≤35	0
36-45	1
>45	2
<i>Stammzelltransplantation vor 1. Rezidiv</i>	
Keine KMT	0
KMT (autolog oder allogene)	2

### **III. ZIEL DER ARBEIT**

Ziel der Arbeit war es die AML-Rezidive die in der Leukämie-Datenbank des Klinikum Großhaderns registriert wurden zu ermitteln und die Rezidive, die am Klinikum selbst behandelt wurden, genauer zu untersuchen. Zum einen sollte das molekulargenetische und zytogenetische Profil der AML-Patienten in ED und Rezidiv erfasst und deren Stabilitäten und Evolution im Verlauf der Erkrankung verglichen werden. Hierbei sollte der Fokus auf den in der Standarddiagnostik erhobenen molekulargenetischen Markern, sowie der Zytogenetik auch in Hinblick auf die Prognose und die Pathogenese von AML-Rezidiven liegen.

Zum anderen sollte der klinische Verlauf und die Rezidivtherapie am Klinikum Großhadern erfasst und Hinblick auf Therapiestrategien und Erfolg näher betrachtet werden.

## **IV. MATERIAL UND METHODEN**

### **1. Molekulare Stabilität genetischer Marker**

Zu Beginn der Arbeit mussten Patienten mit AML-Rezidiven identifiziert werden, sowie Ihre molekularen Marker zu beiden Zeitpunkten erfasst und schließlich statistisch ausgewertet werden. Diese Marker wurden im Labor für Leukämiediagnostik (LfL) der medizinischen Klinik III des Klinikums Großhadern bestimmt, so dass die Datenbank der LfL als primäre Quelle für die Datenerfassung diene.

#### **1.1. Einschlusskriterien**

Um die richtigen Fälle identifizieren zu können mussten entsprechende Ein- und Ausschlusskriterien gewählt werden. So mussten in der verwendeten Datenbank Probeneingänge zum Stichwort AML zu mindestens zwei Zeitpunkten (Erstdiagnose und Rezidiv) vorhanden sein, in der Datenbank oder einem zugehörigen Arztbrief musste vermerkt sein, dass die CR vor dem Rezidiv erreicht wurde und es mussten zytogenetische und/oder molekulargenetische Untersuchungen an den Proben durchgeführt worden sein. Es wurden Probeneingänge von Dezember 1998 bis März 2013 mit eingeschlossen. Des Weiteren mussten die Patienten zu mindestens einem Zeitpunkt am Standort Klinikum Großhadern behandelt worden sein und die klinischen Verläufe der Patienten retrospektiv mit Hilfe von Arztbriefen nachvollziehbar sein. Ebenso mussten die Patienten aus den Untersuchungen ausgenommen werden, die nach Erstdiagnose eine Stammzelltransplantation erhielten, ohne eine vorherige Remission erreichen zu können, da nach Transplantation die Vergleichbarkeit der Genetik von ED und Rezidiv nicht mehr gewährleistet ist.

#### **1.2. Beschreibung der Datenbank**

Als Grundlage der Identifikation diene die LfL-Datenbank des Labors für Leukämiediagnostik des Klinikums Großhadern. Das Labor für Leukämiediagnostik ist zuständig für zytomorphologische Untersuchungen, Zytogenetik- und FISH-Analysen, molekulargenetische Untersuchungen, Immunphänotypisierung und Genexpressionsanalysen. Die Datenbank enthält die Befunde der Patienten, deren Proben für eine der oben genannten Untersuchungen



im Labor für Leukämiediagnostik analysiert wurden. Hierbei handelt es sich größtenteils um hämato-onkologische Patienten des Klinikums Großhadern, aber auch Proben von anderen Kliniken deutschlandweit sind in der LfL zu finden. Jeder Probe wird eine Nummer zugeordnet, unter der man den entsprechenden Befund einsehen kann, wobei die Nummern dem jeweiligen Patient zugeordnet werden und so jeder Patient mehrere Befundseiten entsprechend der Anzahl seiner eingegangenen Proben enthält. Über die Suchfunktion ist es möglich nach einem Patient mit Hilfe des Namens oder Geburtsdatums zu suchen, sowie nach einer Diagnose oder der spezifischen LfL-Nummer eines Befunds. Für die Identifikation der AML Rezidive wurden über das Stichwort „AML“ alle Proben aufgelistet in deren Diagnose AML vermerkt war. In dieser Probenauflistung waren pro Eintrag der volle Name, das Geburtsdatum, die Diagnose, Eingangsdatum der Probe, sowie die LfL-Nummer angegeben. Um die weiteren Befunde einzusehen musste der jeweilige Eintrag ausgewählt werden. Hierbei öffneten sich mehrere Reiter zum jeweiligen Eintrag. Auf der ersten Seite waren der Titel des Eingangs (z.B. AML Rezidiv), sowie Kommentare (Z.n. Chemotherapie) angegeben. Des Weiteren allgemeine Informationen zu Patient und Probe (Geburtsdatum, LfL-Nr, Eingangsdatum etc.), sowie in vielen Fällen die Laborwerte für Hb, Leukozyten und Thrombozyten zum Eingangszeitpunkt, eine zeitliche Übersicht über die Therapie (Datum ED, CR, Datum einer allogenen PBSCT) und die Herkunft der Probe (z.B. Name des externen Klinikums). Diese Angaben waren allerdings teilweise unvollständig und so konnte bei Fehlen einer Angabe, wie CR-Datum oder alloKMT-Datum, nicht darauf geschlossen werden, ob ein entsprechendes Ereignis stattgefunden hat. Ebenfalls wurden z.T. Probeneingänge fehlerhaft beschriftet, d.h. teilweise wurden auch therapierefraktäre AML's als „AML Rezidiv“ bezeichnet, oder der Hinweis „Rezidiv“ fehlte komplett in der Beschreibung und konnte nur durch nähere Betrachtung der Genetik und klinischen Verläufe nachvollzogen werden. Die weiteren Reiter des Eintrags enthalten jeweils eine Seite für die zytogenetische Analyse der Probe, die FISH-Analyse, die molekulargenetische Analyse, die FACS-Analyse, sowie eine Seite mit der Beurteilung und Zusammenfassung des Befunds der Probe durch das Leukämielabor.

### 1.2.1. Identifikation der Rezidive

Zu Beginn der Identifikation erhielt man 20000 Treffer bei Eingabe des Stichworts „AML“ bei Diagnose, am Ende, nach ca. 7 Monaten, waren es bereits 21000. Die Anzahl der Proben pro Patient variierte zwischen 1 und über 30 Befunden. Für die Patienten mit Probeneingängen in der LfL-Datenbank zu mindestens zwei Zeitpunkten, wurden die Einträge angewählt und die entsprechenden Befunde und weiteren Angaben überprüft. Hierbei wurde darauf geachtet, dass zwischen mindestens zwei Probeneingängen ein zeitlicher Abstand von mindestens 3 Wochen bestand, um schon im ersten Schritt Proben auszuschließen, die kein Rezidiv haben konnten, bzw. die zwischenzeitlich keine CR erreichen konnten. Wurde ein entsprechender Patient ausgewählt, musste nun überprüft werden, ob ein Eintrag dem Probeneingang bei Erstdiagnose ohne Vortherapie entsprach und einer einem Probeneingang eines Rezidiv. Hierfür wurden sowohl die klinischen Angaben der Eintragungen berücksichtigt, als auch die zytomorphologischen und molekulargenetischen Befunde. So ergaben sich am Ende 503 Patienten mit AML-Rezidiven, die Probeneingänge zu den Zeitpunkten der ED und dem Rezidiv in der LfL-Datenbank hatten.

### 1.2.2. Erfassen der Befunde

Nach Identifikation eines Rezidivs wurden folgende Parameter erfasst:

**Tabelle 5: Datenbank - Persönliche Daten**

Persönliche Daten (1 Zeitpunkt)	Geburtsdatum
	Geschlecht
	Therapie in Studie
	Studiennummer
	behandelnde Krankenhäuser
	Erkrankungsjahr

**Tabelle 6: Datenbank - Interne Daten**

Interne Daten (3 Zeitpunkte)	LfL-Nummer
	Datum (ED, CR, Rezidiv)
	DNA und RNA vorhanden
	Laborwerte (HB, Leukozyten, Thrombozyten, LDH)
	Blasten in KM und peripherem Blut
	Origin der AML
	FAB-Typ
	ECOG

**Tabelle 7: Datenbank -Genetik**

Genetik (3 Zeitpunkte)	Karyotyp
	FISH-Analyse
	Fusionsgene
	NPM1
	FLT3-ITD mit Status
	FLT3-TKD
	MLL-PTD
	CEPBA
	weitere Mutationen
	FACS

Aus Datenschutzgründen wurden keine Namen erfasst und die Proben mit ihrer entsprechenden LfL-Nummer pseudonymisiert. So konnten zu mindestens zwei (ED, Rezidiv), im besten Fall drei (plus CR) Zeitpunkten alle bestimmten molekularen Marker erfasst werden. Die Marker wurden Dummy-codiert mit „0“ für „Marker ist negativ“, „1“ für „Marker ist positiv“, „2“ für „Marker wurde nicht bestimmt“. Für die FISH-Analysen gab es die zusätzliche Codierung „3“ für den Fall, dass unabhängig von den anderen molekulargenetischen und zytogenetischen Untersuchungen, in der FISH-Analyse keine weitere Mutation nachgewiesen wurde.

### **1.2.3. Selektion und Überprüfung der Fälle**

Um für die klinische Auswertung Fälle zu haben, über die möglichst viele Informationen zur Verfügung standen, wurden für die statistischen Analysen nur Patienten aus dem Klinikum Großhadern ausgewählt. Hierbei war Voraussetzung, dass die Patienten zu mindestens einem Zeitpunkt ihrer AML am Klinikum Großhadern behandelt wurden. Dies traf für 158 Fälle zu. Für diese Fälle standen entsprechend die Arztbriefe digital zur Einsicht zur Verfügung. Bei der Einsicht der Arztbriefe wurden von diesen 158 Fällen 17 Patienten identifiziert, die nach Erstdiagnose, ohne eine vorherige CR1 zu erreichen eine PBSCT erhielten. 2 von diesen Patienten wurden upfront mit einer allogenen PBSCT behandelt, sowie die weiteren 15 therapierefraktär nach erfolgloser Induktionstherapie. Somit entsprachen diese Patienten nicht mehr den Einschlusskriterien. Diese Patienten wurden ebenfalls von den weiteren Analysen ausgenommen, so dass als endgültiges Patientenkollektiv 141 Patienten zur Verfügung standen.

#### **1.2.4. Genetische Klassifizierung und Statistische Auswertung**

Die Statistischen Analysen erfolgten mit Excel 2010 und 2013 sowie SPSS Statistics 20. Die Time-to-event-Kurven wurden mit Hilfe des Kaplan-Meier-Schätzers erstellt. Die zytogenetische Einteilung erfolgte nach MRC [34] zu beiden Zeitpunkten. Obwohl die Bestimmung von *CEBPA* mittlerweile von der WHO routinemäßig empfohlen wird, ist aufgrund des Alters der eingeschlossenen Fälle ab 1999, als diese Empfehlung noch nicht bestand, nur in 33% der Fälle bei Erstdiagnose, sowie im Rezidiv in nur 5% der Fälle eine *CEBPA*-Bestimmung durchgeführt worden. Daher konnte eine Einteilung nach ELN-Klassifikation nicht erfolgen.

#### **1.2.5. Nachbestimmungen**

Da von vielen Patienten nur zu einem Zeitpunkt eine molekulargenetische Bestimmung vorlag, wurde entschieden für die Patienten mit normalem Karyotyp bei Erstdiagnose nachzusehen, bei welchen Patienten noch Material für Nachbestimmungen asserviert war und für diese rückwirkend die Marker „*NPM1*“, „*FLT3-ITD*“ und „*FLT3-TKD*“ durch das Labor für Leukämiediagnostik nachzubestimmen. Für diese Analysen wurden RLT-Reste verwendet. So konnte die Anzahl der molekulargenetischen „matched pairs“ für die statistische Auswertung nochmal erhöht werden. Um für den Marker *CEBPA* eine aussagekräftige Zahl an Bestimmungen zu erreichen, stand rückwirkend nicht mehr in ausreichenden Fällen asserviertes Material zur Verfügung, so dass auf diese Nachbestimmung verzichtet wurde.

## **2. Klinisches follow-up**

Für die Patienten im 1. Rezidiv, die wegen ihrer AML zu mindestens einem Zeitpunkt im Klinikum Großhadern behandelt wurden (n=141), konnte die Rezidivtherapie, der Erfolg der Rezidivtherapie, sowie das Überleben dieser Patienten betrachtet werden.

### **2.1. Erhebung und SAP**

Im follow-up wurden die elektronisch hinterlegten Arztbriefe der Patienten herausgesucht und ab Zeitpunkt des 1. Rezidivs durchgesehen. Des Weiteren konnte im Patientenorganizer des SAP Systems ein Überblick über die Aufenthalte der Patienten im Klinikum Großhadern eingesehen werden. Im Falle

eines Ablebens im Klinikum Großhaderns konnte hier auch das entsprechende Sterbedatum eingesehen werden. Hierbei wurden folgende Parameter erfasst:

**Tabelle 8: Follow-Up - Interne Daten**

Interne Daten	LfL-Nr. 1. Rezidiv
	Rezidivdatum (1. Rezidiv)
	Sterbedatum
	Datum letzter Kontakt
	CR2 Datum

**Tabelle 9: Follow-Up - Rezidivtherapie**

Rezidivtherapie	Palliativ/Kurativ
	KMT-Datum
	Konditionierungstherapie
	Spenderdaten (fremd/familiär, HLA-Status)
	Rezidivchemotherapie

## 2.2. Auswertung mit Excel und SPSS

Die Auswertung erfolgte hier ebenfalls mit Excel 2010 und 2013 sowie SPSS Statistics 20. Die Überlebenskurven wurden mit Hilfe des Kaplan-Meier-Schätzers erstellt. Hierbei bestand nur für die Patienten, die im Klinikum verstorben waren ein gesichertes Sterbedatum. Die anderen Patienten wurden zum Zeitpunkt ihres letzten Kontakts, oder zum Zeitpunkt einer erfolgten Knochenmarkstransplantation zensiert.

## 3. Definitionen

Für die Bestimmung des CR-Zeitpunkts wurde die morphologische CR-Definition laut ELN angewendet. [12] Ebenso nach ELN-Empfehlungen wurde als Rezidiv gezählt wenn über 5% Blasten im Knochenmark, Blasten im peripheren Blut oder ein extramedulläres Rezidiv gefunden wurde. OS- und RFS-Kurven wurden zum Zeitpunkt einer allogenen Stammzelltransplantation zensiert. Zur Evaluierung der Prognose wurde der Breems-Score angewendet.[64]

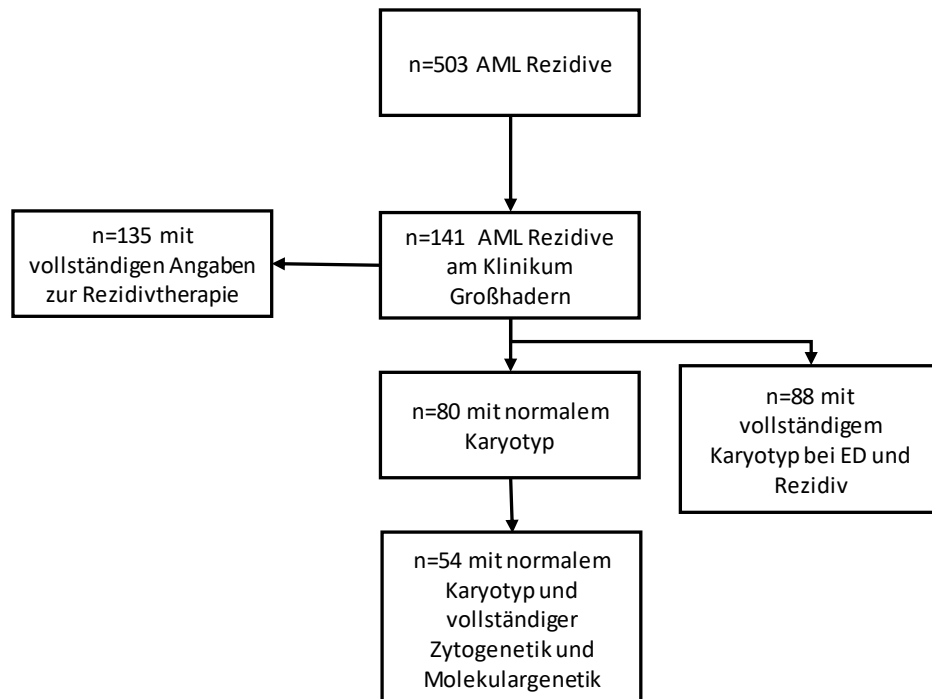
## **V. ERGEBNISSE**

### **1. Patientenselektion**

Wie im Methodenteil beschrieben konnten über die LfL-Datenbank 503 AML-Rezidive identifiziert werden. Von diesen Fällen wurden 141 im Laufe ihrer Erkrankung am Klinikum Großhadern behandelt und konnten somit in ihrem klinischen Verlauf näher betrachtet werden. Für 135 dieser Patienten waren vollständige Angaben zur Rezidivtherapie verfügbar, während bei 6 Patienten die klinischen Verläufe nach erfolgreichem 1. Rezidiv nicht mehr nachvollziehbar waren. Für diese 135 Patienten wurden die Rezidivtherapie und das Überleben näher betrachtet

Vollständige Bestimmungen für den Karyotyp bei Erstdiagnose und Rezidiv standen für 88 Patienten zur Verfügung. Diese werden unter V/2.6. weiter analysiert. Bei 80 von 141 Patienten bestand bei Erstdiagnose ein normaler Karyotyp. Von diesen waren in 54 Fällen vollständige Angaben über Karyotyp und Molekulargenetik vorhanden, so dass sich eine Untergruppe von 54 Patienten mit normalem Karyotyp bei Erstdiagnose mit vollständigen Aussagen über Zytogenetik und Molekulargenetik für die Marker *NPM1* und *FLT3-ITD* ergibt. Dieses spezielle Kollektiv wird in V./3. näher betrachtet.

Der Selektionsprozess ist in Abbildung 1 dargestellt.



**Abbildung 1: Patientenselektion**

## **2. Kollektiv mit vollständigen Angaben zur Rezidivtherapie (n=135)**

### **2.1. Patientencharakteristika Übersicht n=135**

Im Folgenden sind die Patientencharakteristika bei Erstdiagnose zusammengefasst. Das mediane Alter betrug 56 Jahre, wobei der älteste Patient 89,7 und der jüngste 21,2 Jahre alt war. 46,3% der Patienten waren männlich. 79 (56%) Patienten hatten bei Erstdiagnose einen normalen Karyotyp. Bei 81,4% handelte es sich um de novo AML's, während 14% als sAML und 4% als t-AML klassifiziert wurden. Die durchschnittliche Zahl der Blasten im Knochenmark betrug 56%. Weitere Angaben, wie die durchschnittlichen Laborwerte für Leukozyten, Hämoglobin, Thrombozyten, LDH, sowie eine Übersicht über die Verteilung der FAB-Typen sind in Tabelle 10 einzusehen.

**Tabelle 10: Patientencharakteristika**

Patientenmerkmale	Ergebnisse	verfügbar in X, n (%)
Alter, Jahre		135 (100)
Median	56,0	
Wertebereich	21,2-89,7	
Leukozytenzahl, G/l		130 (96)
Median	44,5	
Wertebereich	0,3-332	
Thrombozytenzahl, G/l		128 (95)
Median	82,2	
Wertebereich	5-480	
Hämoglobinwert, g/l		128 (95)
Median	9,5	
Wertebereich	5,2-15,2	
LDH, U/l		108 (80)
Median	584	
Wertebereich	127-4623	
Blasten im Knochenmark, %		120 (89)
Median	57	
Wertebereich	0-96	
Blasten im peripheren Blut, %		65 (48)
Median	39	
Wertebereich	0-96	
Weiblich, n (%)	72 (53,3)	135 (100)
Performance status (ECOG), n (%)		70 (52)
0	23 (17)	
1	14 (10)	
2	31 (23)	
3	2 (1)	
4	0 (0)	
Ursprung der AML, n (%)		135 (100)
de novo	110 (81)	
sAML	20 (15)	
t-AML	5 (4)	
NPM1+, n (%)	41 (30)	107 (79)
FLT3-ITD+, n (%)	32 (24)	128 (95)
FLT3-TKD+, n (%)	14 (10)	122 (90)
FAB Klassifikation, n (%)		129 (96)
M0	5 (4)	
M1	30 (21)	
M2	44 (31)	
M3	3 (2)	
M4	25 (18)	
M5	12 (9)	
M6	9 (6)	
biphänotypisch	1 (1)	



Karyotyp, n (%)		134 (99)
normal	76 (56)	
günstig	6 (4)	
intermediär	110 (81)	
ungünstig	18 (13)	
Allogene Knochenmarkstransplantation, n (%)		
Erstdiagnose	12 (9)	
Rezidiv	84 (62)	
RFS, Monate		
Median	8,37	

## 2.2. Initiale Behandlung

Nach Erstdiagnose wurden 84 (62,2%) Patienten innerhalb von Studien behandelt. Die Therapieregime der verbliebenen 51 Patienten wurden einer Studien-analogen Behandlung zugeordnet. So wurden 54 Patienten im Rahmen der AMLCG99-Studie und 19 Patienten Studienanalog nach demselben Regime behandelt. Des Weiteren wurden 14 Patienten in der AMLCG2004 und 13 in der AMLCG2008-Studie behandelt. Eine Übersicht über die Verteilung nach Studien und Studien-analoger Behandlung ist in Tabelle 11 dargestellt.

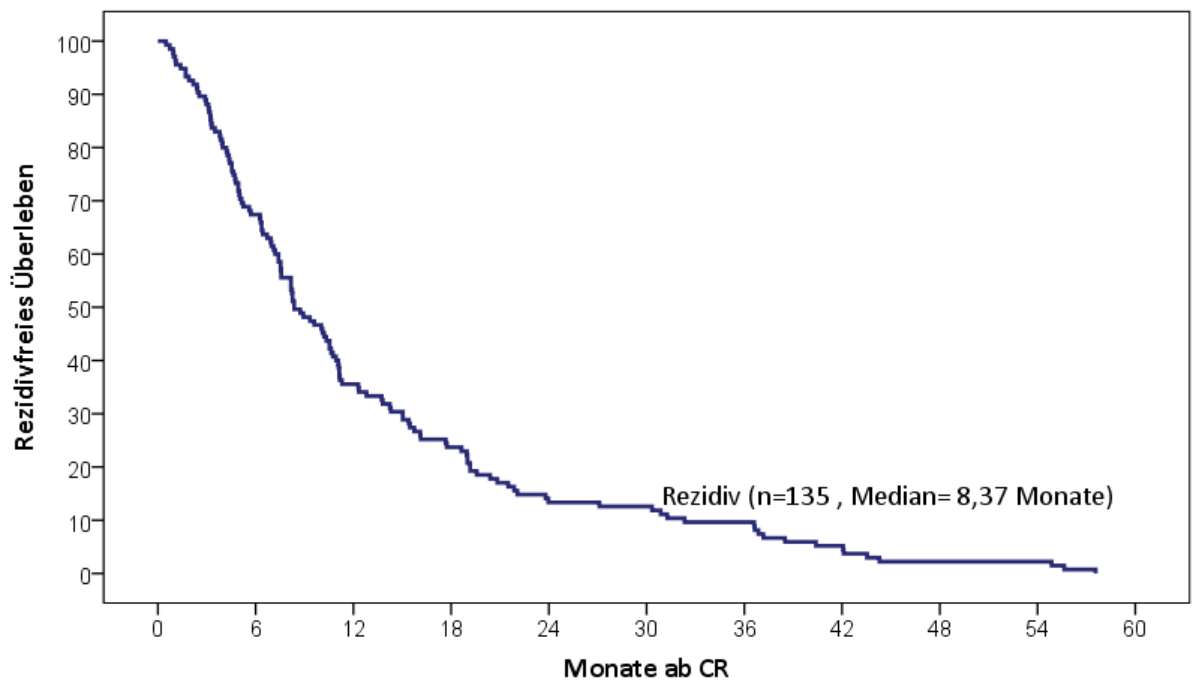
**Tabelle 11: Therapie in Studien**

	Studie	Studienanalog
<i>AMLCG99</i>	54	19
<i>AMLCG2004</i>	14	5
<i>AMLCG2008</i>	13	3
<i>AML-HD/98A Studie</i>	2	3
<i>AML1-/99-Protokoll</i>	1	6
<i>AMLCG92</i>	0	2
<i>AML-SG07/04</i>	0	2
<i>7+3</i>	0	8
<i>AML/2-95</i>	0	1
<i>andere</i>	0	2
<i>Gesamt</i>	84	51

## 2.3. Rezidivfreies Überleben

In Abbildung 2 ist das Rezidiv-freie Überleben, die Zeit von der CR1 bis zum Rezidiv, dargestellt. Die mediane Zeit bis zum Auftreten eines Rezidivs betrug 8,37 Monate. Da im Rahmen der Arbeit nur AML-Rezidive betrachtet wurden,

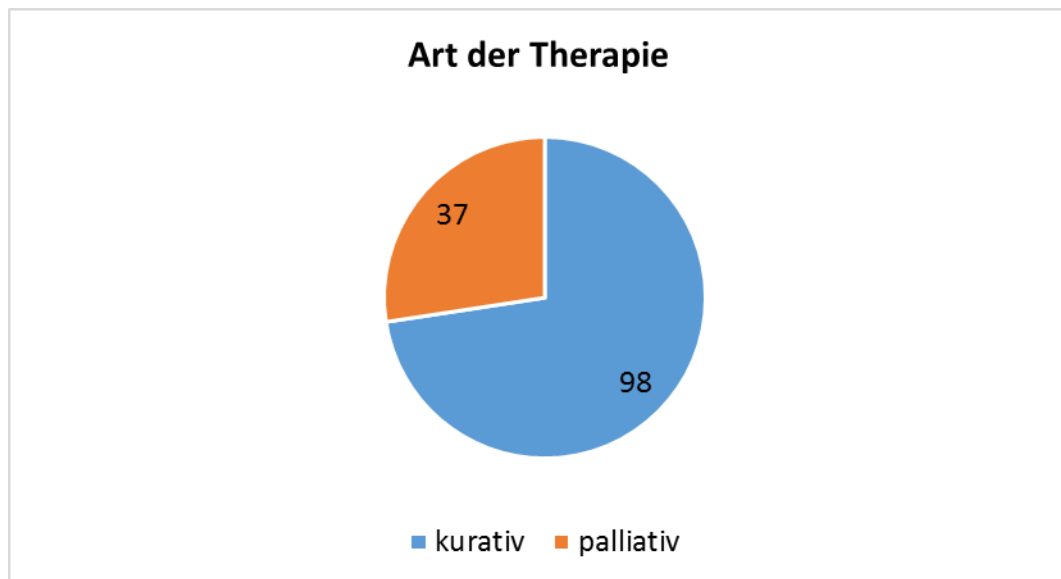
beträgt die Rezidivrate 100%. Die Frührezidivrate mit einem Rezidiv innerhalb der ersten 6 Monate beträgt 34,0% (n=46/135).



**Abbildung 2: Rezidivfreies Überleben (CR1-Rezidiv)**

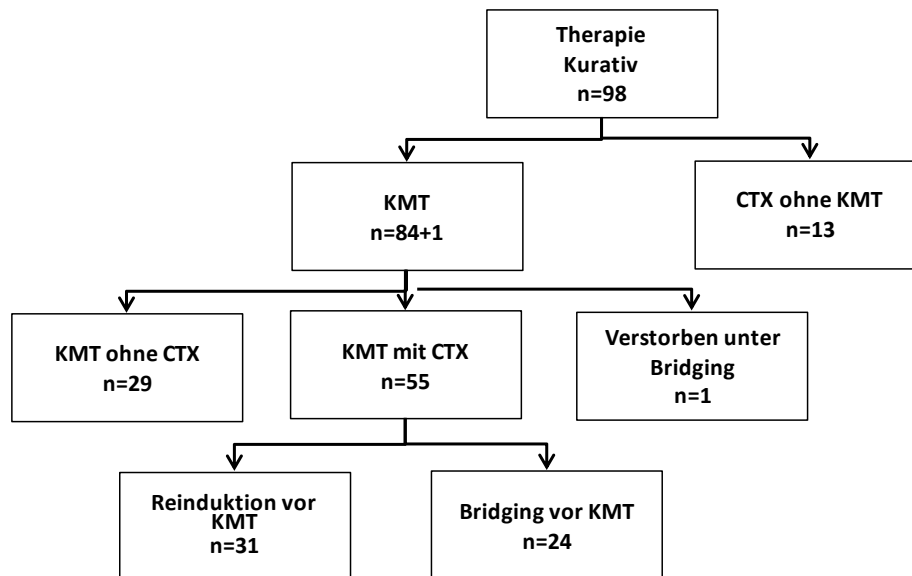
#### **2.4. Rezidivtherapie**

Zur Einteilung der Rezidivtherapien wurden eine palliative und kurative Behandlung unterschieden. Als palliativ wurden diejenigen Fälle betrachtet, für die kein kuratives Therapieziel definiert wurde und die weder eine Reinduktionstherapie, noch eine Bridgingtherapie mit dem Ziel einer Stammzelltransplantation erhielten. Dies war in 37 Fällen (26,4%) gegeben. 98 Patienten (69,3%) wurden kurativ behandelt.



**Abbildung 3: Art der Therapie**

Von den kurativ behandelten Patienten erhielten 84/98 (85,7%) eine allogene Stammzelltransplantation, 13/98 (13,3%) wurden rein chemotherapeutisch behandelt. 55 von 84 (65,5%) der transplantierten Patienten erhielten vor ihrer Transplantation eine chemotherapeutische Behandlung. Von diesen erhielten 31/55 (56,4%) eine Reinduktionstherapie und 24/55 (43,6%) eine Bridging-Therapie vor Transplantation. 29/84 (34,5%) wurden ohne weitere chemotherapeutische Behandlung mittels KMT therapiert. 1 Patient verstarb unter Bridging-Therapie vor Transplantation.



**Abbildung 4: Kurative Rezidivtherapie Übersicht**

#### 2.4.1. Chemotherapie im Rezidiv

Es wurden insgesamt 69/135 (51,1%) Patienten Chemotherapien in kurativer Absicht verabreicht. Weitere 27/135 (20,0%) Patienten erhielten eine palliative Chemotherapie. Im Folgenden sollen nur die kurativen Chemotherapien betrachtet werden. Die Chemotherapien der Rezidivtherapie können je nach Therapieziel den Untergruppen „Bridging“ und „Reinduktion“ zugerechnet werden. So werden die Chemotherapien, die mit dem Ziel einer allogenen Stammzelltransplantation überbrückend, meist während der Spendersuche, gegeben werden als „Bridging“ bezeichnet, hier in 25/69 (36,2%) Fällen gegeben. Hierunter befindet sich ein Einzelfall der unter der Konditionierung in primär kurativer Absicht verstarb, bevor die Transplantation durchgeführt werden konnte. Alle anderen Fälle erhielten nach der Bridging-Therapie eine Transplantation.

Als „Reinduktion“ werden die Therapien bezeichnet, die in primär kurativer Absicht verabreicht werden. In diesem Fall kann entweder eine alleinige Reinduktionschemotherapie erfolgen oder nach der Reinduktion noch eine Stammzelltransplantation durchgeführt werden. Tabelle 12 stellt eine Übersicht der kurativen Chemotherapien (n=69) dar.

**Tabelle 12: Kurative Chemotherapien**

	<b>Bridging + Transplantation</b>	<b>Reinduktion + Transplantation</b>	<b>Reinduktion nur CTX</b>	<b>Unter Bridging verstorben</b>
	24 (34,8%)	31 (44,9%)	13 (18,8%)	1 (1,4%)
low dose Ara-C based	24	0	0	0
AraC based	0	12	2	0
s-HAI	0	8	4	0
FLAG-IDA	0	6	1	0
HAM based	0	4	3	0
ATRA	0	0	2	0
Andere	0	1	1	1

Die Bridging Regime beinhalteten ausschließlich low-dose Cytarabin, teilweise intermittierend verabreicht. Als Reinduktionstherapien wurden gemäß Rezidiv-Chemotherapie-Protokollen HAM, s-HAI, FLAG-IDA, ATRA+ATO sowie Cytarabin mit 100mg/m<sup>2</sup> Körperoberfläche (KOF) eingesetzt. Hochdosis-Cytarabin wurde in einigen Fällen mit einem Anthrazyklin kombiniert. Die nicht näher bezeichneten Chemotherapien bestanden im Falle der Reinduktion vor Transplantation aus Mitoxantron und Etoposid, wobei in diesem Fall eine Double-cord-transplantation durchgeführt wurde. Die Reinduktion ohne weitere KMT in einem speziellen Fall bestand aus low-dose-Cytarabin mit folgender donor lymphocyte infusion. Der Patient, der während des Bridgings verstarb erhielt bereits in Vorbereitung auf die KMT Chemotherapien gemäß FLAMSA-Protokoll.

#### **2.4.2. KMT im Rezidiv**

84/135 (62,2%) Patienten wurden im Rahmen ihrer Rezidivtherapie mit einer allogenen Stammzelltransplantation behandelt. 36/84 (42,9%) dieser Patienten erhielten eine Stammzellspende eines Familienmitglieds. 61/84 (72,6%) konnten HLA-ident transplantiert werden, während bei 10/84 (11,9%) ein HLA-mismatch vorlag.

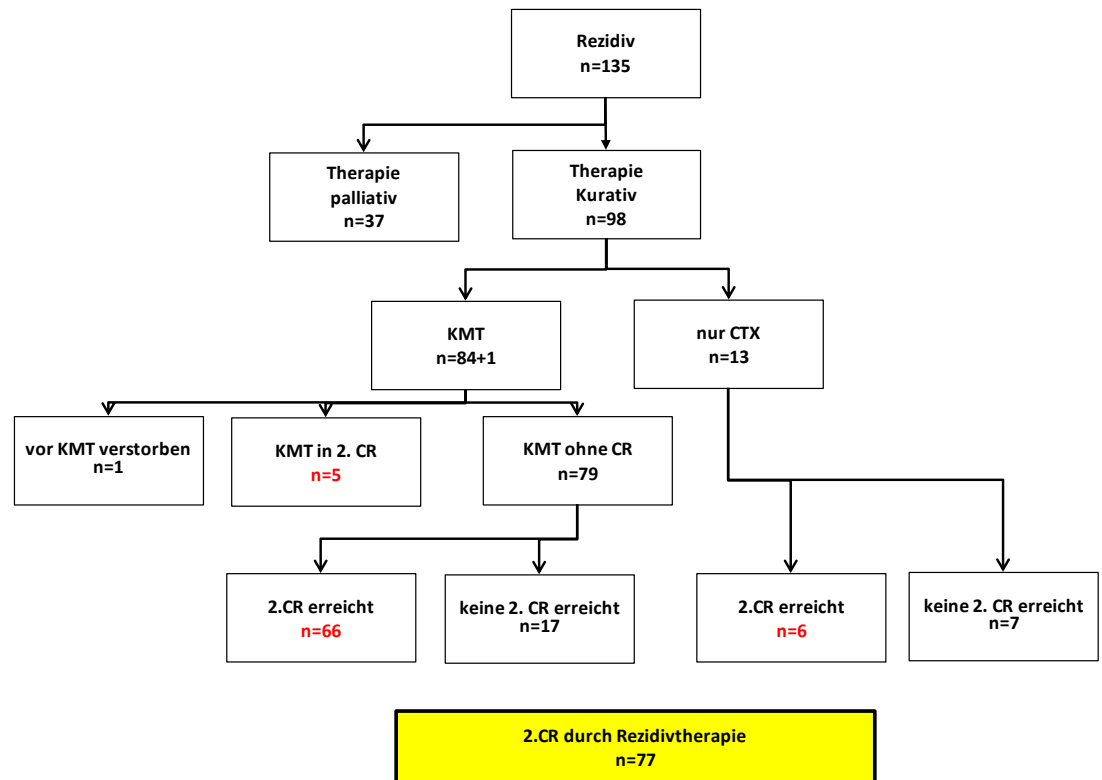
Die Konditionierungstherapie wurde danach eingeteilt, ob eine Ganzkörperbestrahlung mit 4Gy stattgefunden hat. Diese wird hier als TBI-based (Total body irradiation) bezeichnet und wurde bei 42/84 (50,0%) der Patienten durchgeführt. (siehe Tabelle 13)

**Tabelle 13: Transplantationscharakteristika (n=84)**

Transplantationscharakteristika	n=	%
Spender		
Familienspender	36	42,9
Fremdspender	48	57,1
Myeloablative Therapie		
TBI based	42	50
Non-TBI based	42	50
HLA Merkmale		
HLA ident	61	72,6
HLA mismatch	10	11,9
haploident	12	14,3
keine Angabe	1	1,2

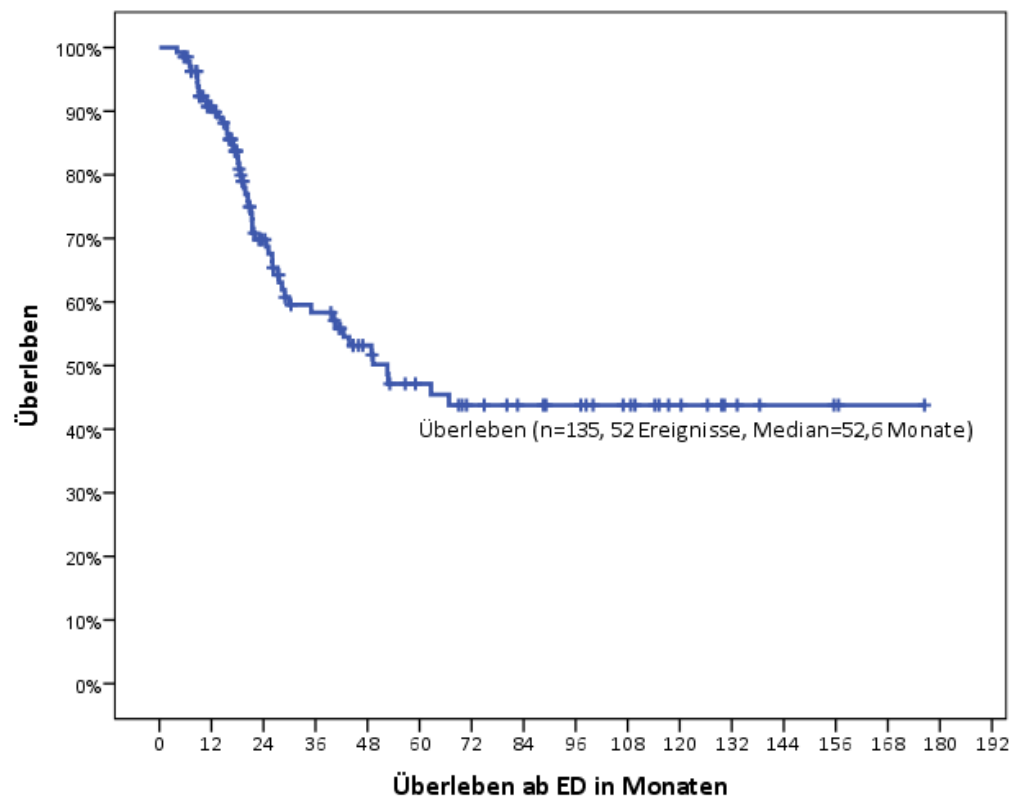
#### **2.4.3. Erfolg der Rezidivtherapie**

98/135 (72,6%) Patienten erhielten eine kurative Rezidivtherapie. Der Erfolg der Therapien lässt sich zum einen an der Zahl der erreichten Remissionen, sowie dem Überleben ablesen. In Abbildung 5 ist eine Übersicht über das Erreichen einer zweiten Remission nach vorangegangener Therapie dargestellt. So konnten 77/135 Patienten eine CR2 erreichen. Das entspricht 57,0% aller Patienten und 78,6% der Patienten, die einen kurativen Therapieansatz erhielten. Von den 84 Patienten, die im Rahmen der Rezidivtherapie eine allogene Stammzelltransplantation erhielten, konnten 71 (84,5%) eine weitere Remission erreichen, jedoch nur 7 (53,8%) der 13 Patienten mit alleiniger kurativer Chemotherapie als Rezidivtherapie.

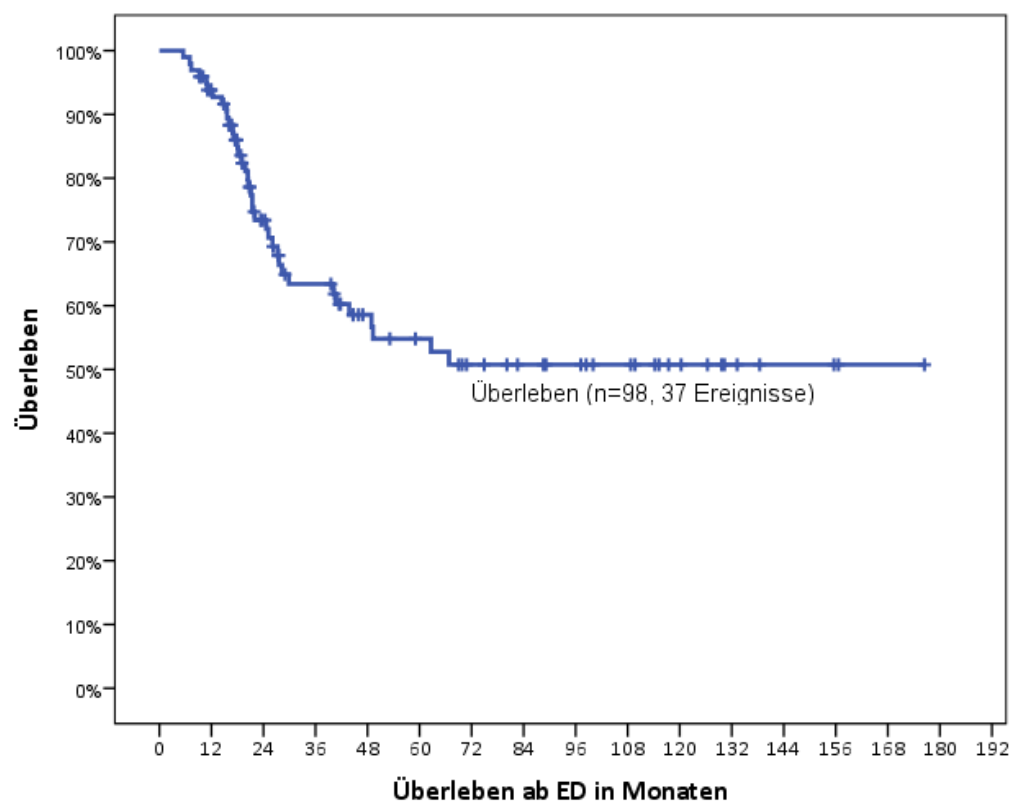


**Abbildung 5: Erfolg Rezidivtherapie**

Das mediane Gesamtüberleben nach ED betrug 52,6 Monate, das nach 1. Rezidiv 35,4 Monate für die gesamte Kohorte. Für die Kohorte mit den kurativ behandelten Fällen (n=98) konnte aufgrund zu weniger Ereignisse kein Median erstellt werden.



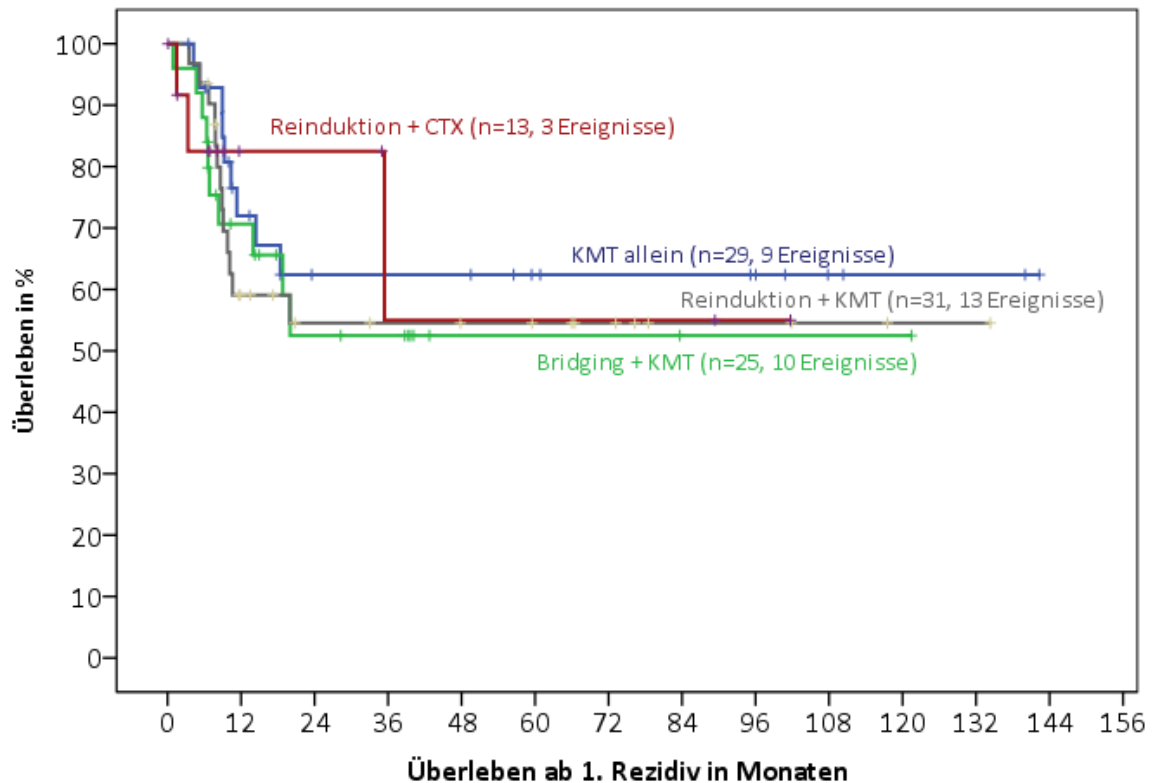
**Abbildung 6: Gesamtüberleben ab ED**



**Abbildung 7: Überleben ab ED bei kurativer Rezidivtherapie**



In Abbildung 8 ist das unterschiedliche Überleben nach Art der Rezidivtherapie aufgezeigt. Ein Median ließ sich aufgrund der niedrigen Fallzahlen und hoher Zensurraten der einzelnen Gruppen nicht ermitteln, so dass ebenfalls kein signifikanter Unterschied im Überleben der einzelnen Gruppen gezeigt werden konnte.



**Abbildung 8: Überleben nach 1. Rezidiv**

#### 2.4.4. Breems-Score

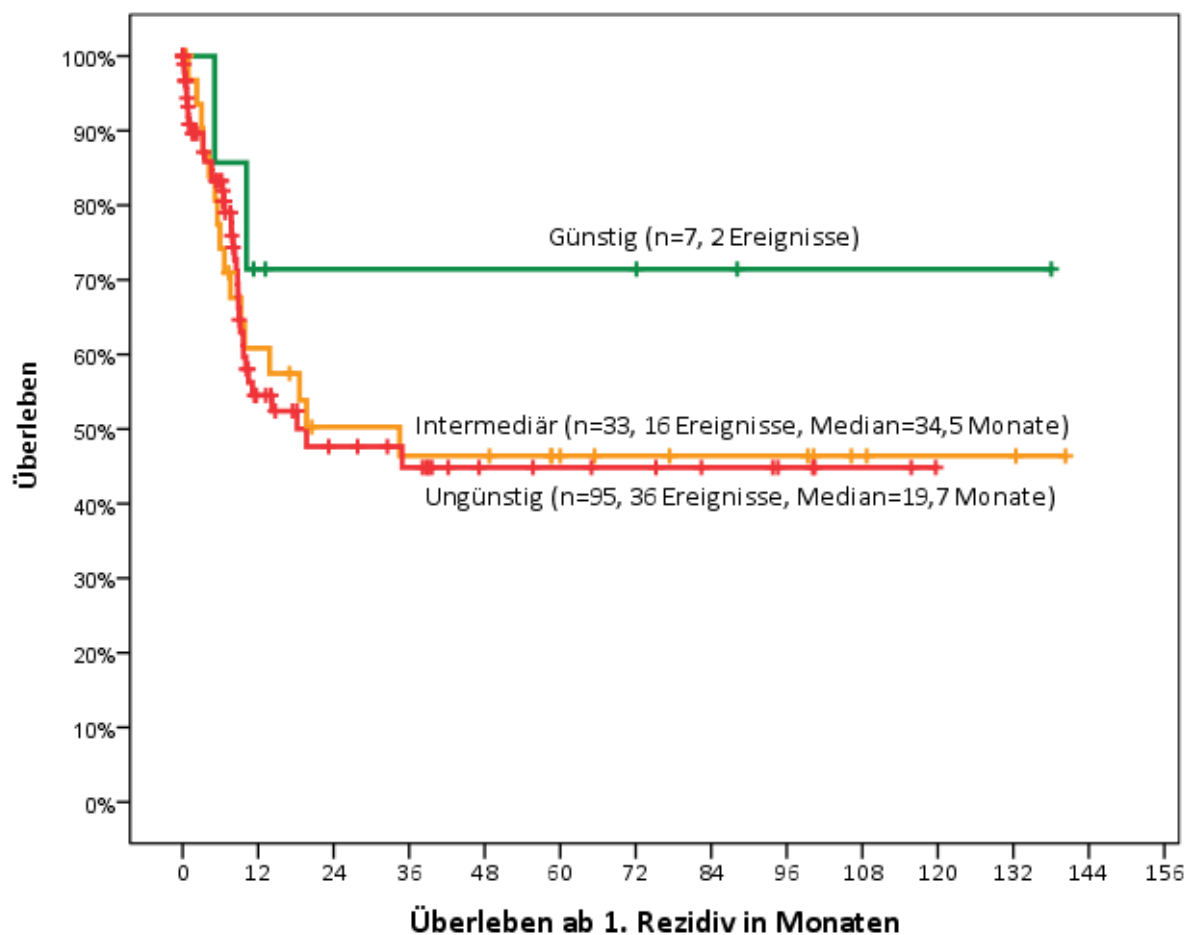
Zur Einordnung des prognostischen Index dieser Kohorte wurde der Breems Score zum Zeitpunkt des ersten Rezidivs berechnet (siehe II/6.3.), der Alter, Zytogenetik, vorangegangene SCT, sowie RFS berücksichtigt (Tabelle 13).[64]

**Tabelle 14: Breems Score Auswertung**

Breems Kategorie	Breems Score n (%)
Günstig	7 (5,2%)
Intermediär	33 (24,4%)
Ungünstig	95 (70,4%)

Hier zeigt sich für den Großteil (70,4%) unserer Kohorte ein ungünstiger Score zum Zeitpunkt des ersten Rezidivs. Nur 5,2% werden zur günstigen Kategorie gezählt. Insgesamt spricht dies für ein Kollektiv mit einer schlechten Prognose in Hinblick auf Überleben und Erfolg der Rezidivtherapie. Eine solche Verteilung war aufgrund der Einschlusskriterien erwartet. Dieses Ergebnis wird in den Ergebnissen zum Erfolg der Rezidivtherapie teilweise wiedergespiegelt.

Bei der Berechnung der Überlebenskurven gemäß des prognostischen Scores zeigt sich folgendes Ergebnis. (Abbildung 9)

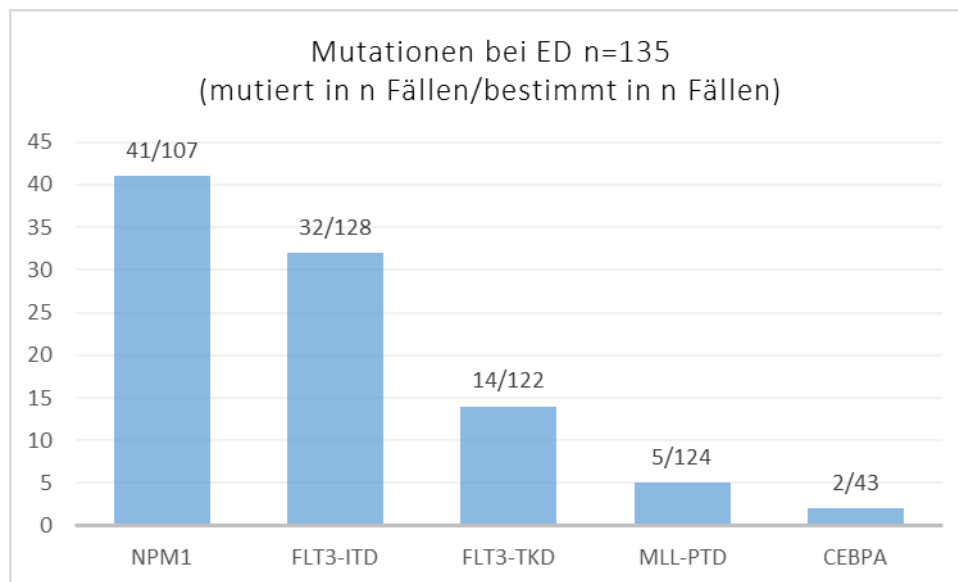


**Abbildung 9: Überleben nach Breems-Kategorie ab 1. Rezidiv**

In der Graphik erscheint die Gruppe mit günstigem Prognosescore mit deutlichem Überlebensvorteil. Aufgrund der zu geringen Gruppengröße, sowie zu weniger Ereignisse sind die Unterschiede zwischen den einzelnen Untergruppen jedoch nicht signifikant.

## 2.5. Überblick der genetischen Befunde

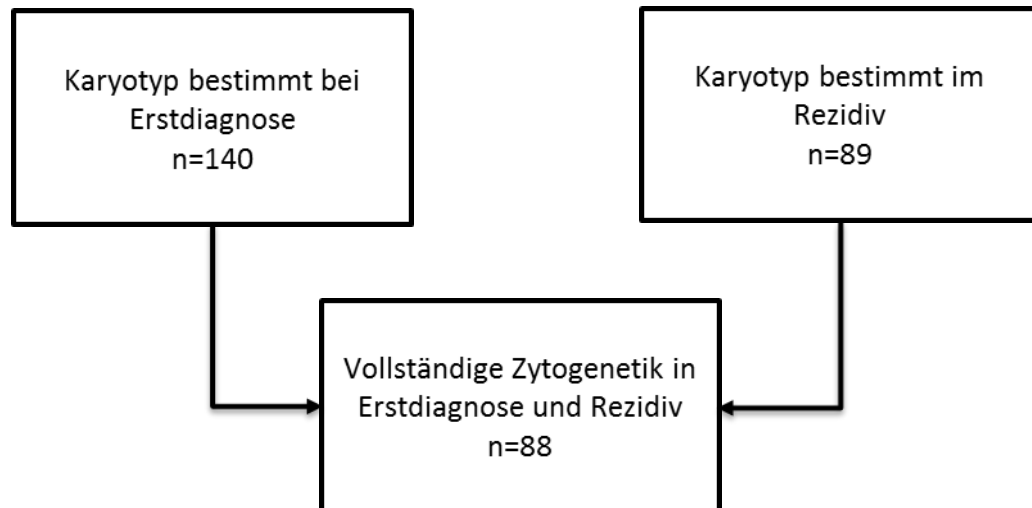
Bei Erstdiagnose wurden unterschiedliche molekulargenetische und zytogenetische Untersuchungen bei den Patienten durchgeführt und folglich nicht alle Mutationen bei allen Patienten untersucht. In Abbildung 10 sind die genetischen Befunde bei Erstdiagnose als Übersicht dargestellt. So wurden am häufigsten die *NPM1*- (41 mutiert/107 bestimmt), sowie die *FLT3-ITD*-Mutation bestimmt (32 mutiert/128 bestimmt), während die *CEBPA*-Mutation nur in wenigen Fällen bei Erstdiagnose (43) und im Rezidiv bei keinem Patienten bestimmt wurde. Aus diesem Grund wurden für die Auswertung der molekulargenetischen Stabilitäten in V./3. nur die Untergruppe mit vollständigen Bestimmungen für *NPM1* und *FLT3-ITD* ausgewählt, um die größtmögliche Fallzahl und somit Aussagekraft zu erhalten.



**Abbildung 10: Übersicht Mutationen**

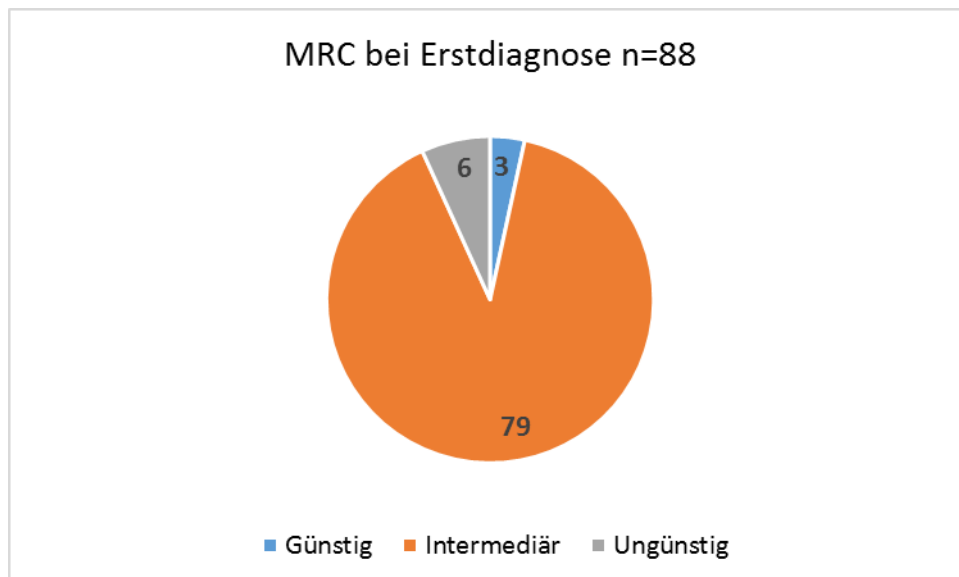
## 2.6. Vollständige Zytogenetik

Wie bei den molekulargenetischen Analysen wurden auch bei der Zytogenetik nicht alle Patienten vollständig untersucht. Vor allem im Rezidiv fehlt in 53 Fällen die Bestimmung des Karyotyps, so dass insgesamt 88 Patienten für einen Vergleich der Zytogenetik bei Erstdiagnose und Rezidiv zur Verfügung stehen und in V/2.5.1.1. näher betrachtet werden. (Abbildung 11)



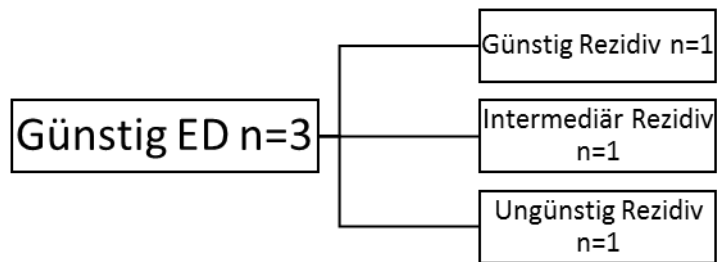
**Abbildung 11: Bestimmungen Zytogenetik**

Für die Einteilung in zytogenetische Gruppen, wurde die MRC-Klassifikation (siehe II./6.2.) verwendet und nur die Patienten mit vollständiger Karyotypenanalyse in Erstdiagnose und Rezidiv (n=88) betrachtet. So hatte bei Erstdiagnose mit 90% der Großteil der Patienten einen intermediären Karyotyp und nur 3% einen günstigen Karyotyp. Insgesamt hatten 80 Patienten keine Aberrationen und somit einen normalen Karyotyp bei Erstdiagnose. In der Untergruppe der Fälle mit vollständigen zytogenetischen Bestimmungen entspricht das 58 Patienten (65,9%). Diese werden nach MRC den intermediären Karyotypen zugeordnet und nicht extra aufgeführt.

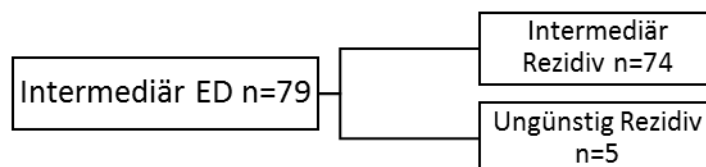


**Abbildung 12: MRC bei ED**

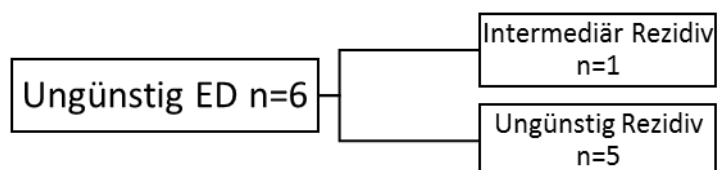
Die Abbildungen 13, 14 und 15 zeigen die Evolution der Karyotypen von Erstdiagnose bis Rezidiv. So zeigt sich, dass nur ein 1 günstiger Fall im Rezidiv einen günstigen Karyotyp behält, während bei den intermediären Karyotypen 74/79 (93,7%) im Rezidiv konstant bleiben. Insgesamt bleiben von den 88 Patienten 80 (90,9%) innerhalb ihrer MRC-Einordnung konstant, während 7/88 (8,0%) im Rezidiv einer schlechteren Kategorie zuzuordnen sind. Bei einem Patienten mit ungünstigem Karyotyp bei Erstdiagnose, der im Rezidiv einem intermediären Karyotyp zuzuordnen ist, wurde bei Erstdiagnose eine inv(3) festgestellt, die nun im Rezidiv nicht mehr zu finden war. Insgesamt zeigt sich aber, dass die zytogenetische Einteilung auch bei den AML-Rezidiven eine hohe Stabilität aufweist und es im Falle einer Veränderung der Zytogenetik eher zu einer Verschlechterung im Sinne der zytogenetisch prognostischen Einordnung kommt.



**Abbildung 13: Evolution Zytogenetik ED-Rezidiv (Günstig)**



**Abbildung 14: Evolution Zytogenetik ED-Rezidiv (Intermediär)**

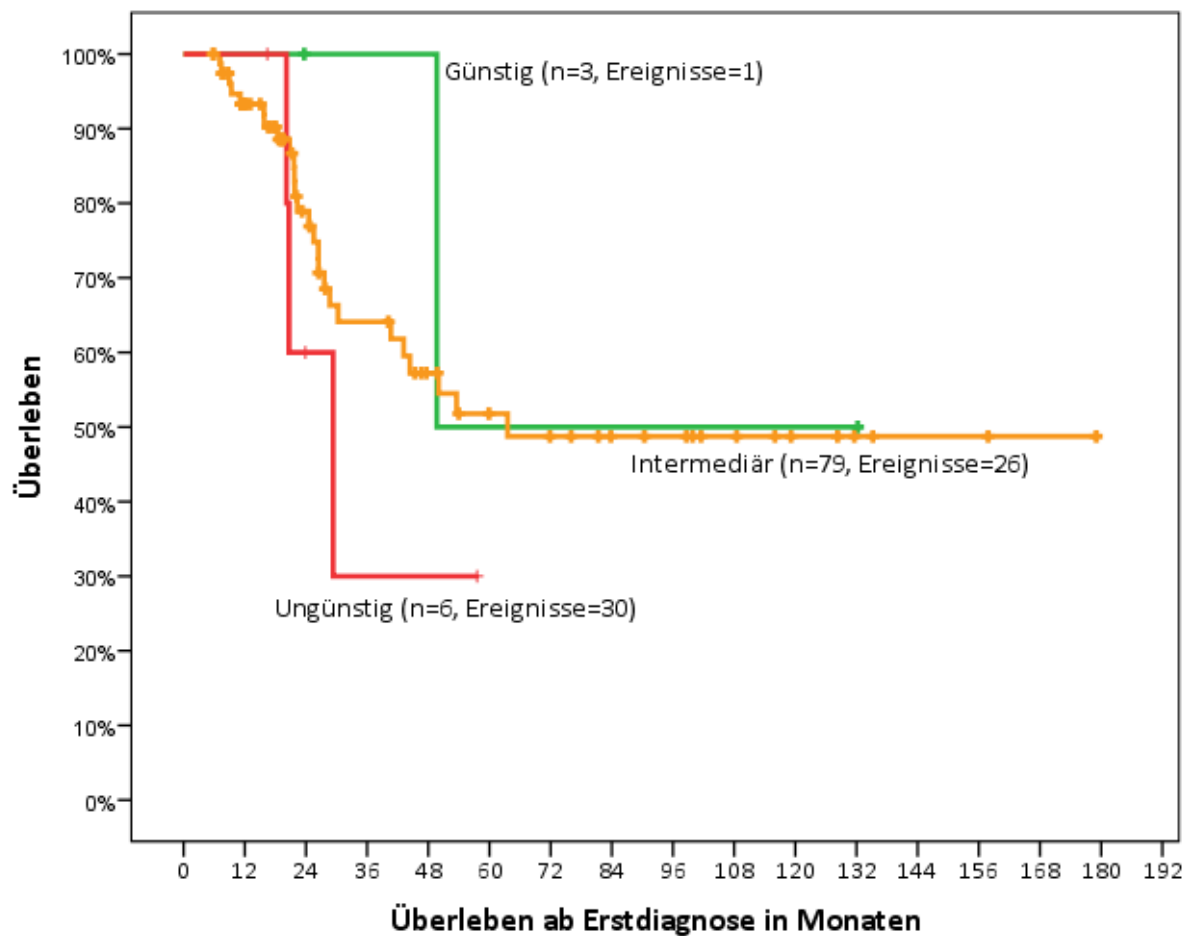


**Abbildung 15: Evolution Zytogenetik ED-Rezidiv (Ungünstig)**

### 2.6.1. Überleben nach Zytogenetik

Bei der Auswertung der Überlebenszeiten nach Karyotyp wird zuerst das Überleben nach Erstdiagnose mit der zu diesem Zeitpunkt bestehender Zytogenetik betrachtet. In Abbildung 16 zeigt sich ein tendenzieller Überlebensvorteil für die günstige zytogenetische Gruppe. Ein Vergleich der

Überlebenszeiten im Log-Rank-Test ist aber aufgrund zu geringer Patientenzahlen in den einzelnen Gruppen nicht signifikant.



**Abbildung 16: Überleben nach Zytogenetik (ED-Tod)**

Bei der Analyse der Überlebenszeiten nach Rezidiv, mit den nun veränderten Karyotypen zeigt sich ein ähnliches Bild der Überlebenszeiten, wie nach Erstdiagnose. Auch hier ist der Unterschied im Überleben zwischen den Untergruppen nicht signifikant. (Abbildung 17)

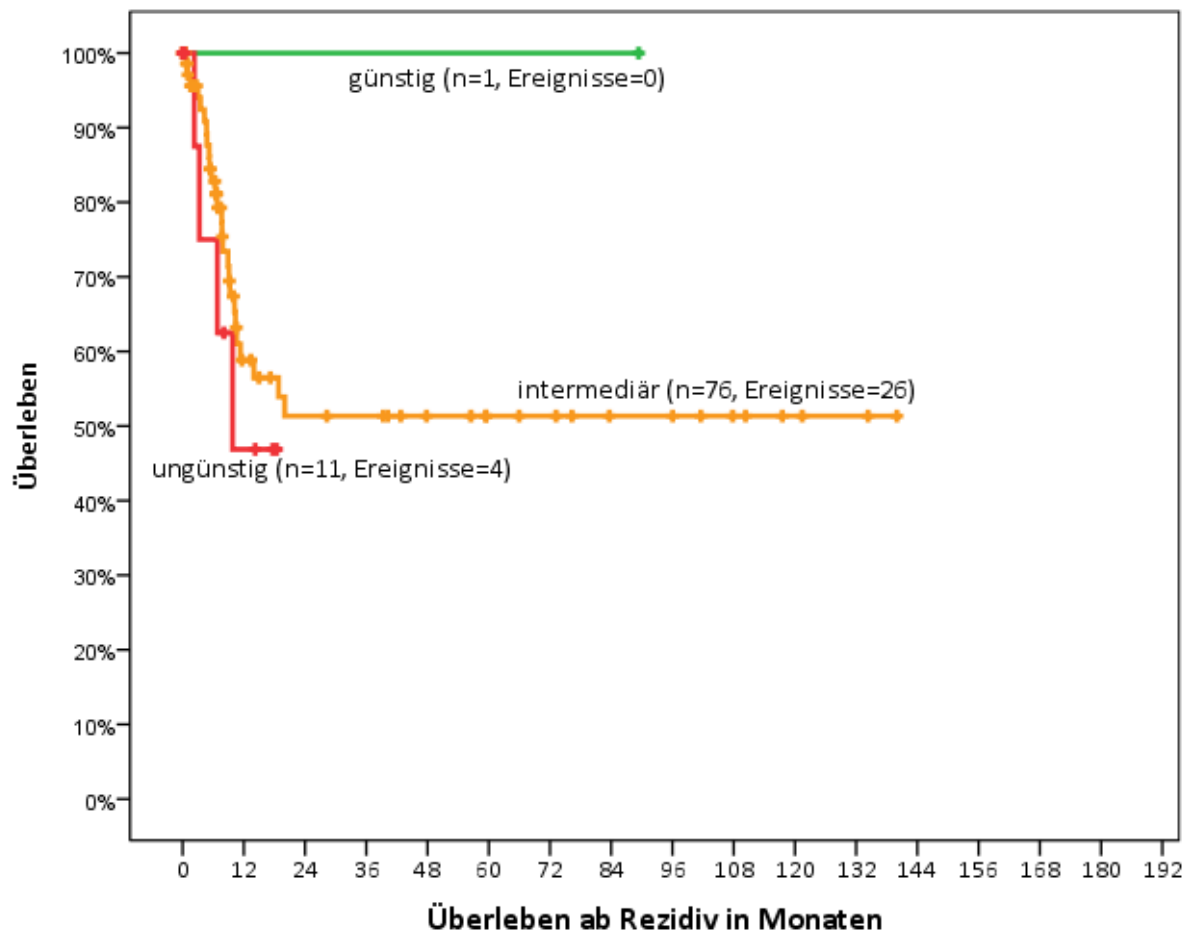
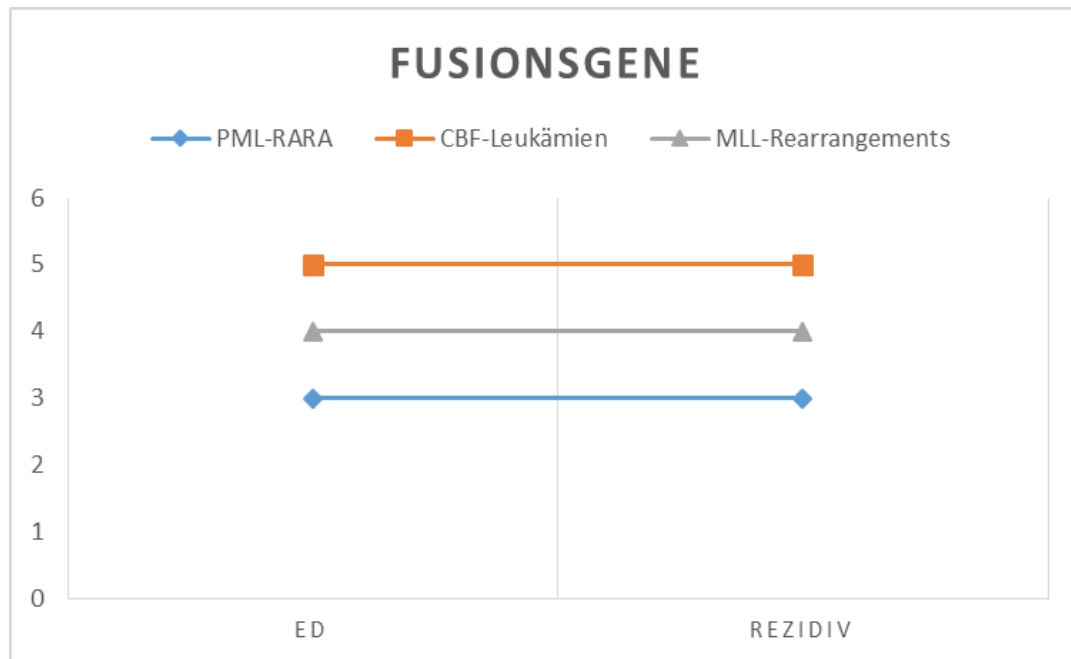


Abbildung 17: Überleben nach Zytogenetik (Rezidiv-Tod)

## 2.7. Fusionsgene

Bei den durchgeführten FISH-Analysen wurden auch Fusionsgene gefunden. Es handelt sich um 3 Fälle mit AML M3 mit der definierenden *PML-RARA* Translokation, 5 Fälle von *CBF-Leukämien* und 4 *MLL-Rearrangements*. Bei den *CBF-Leukämien* traten 3 Fälle mit *AML1-ETO* und 2 mit *CBFb-MYH11* Transfusionsgenen auf. Von den *MLL-Rearrangements* wurden 2 näher bestimmt. Es handelte sich in beiden Fällen um eine *MLL-AF9*. All diese Patienten wurden im Rezidiv auf die bei Erstdiagnose gefundenen Fusionsgene untersucht. Dabei zeigte sich eine Stabilität von 100%. (siehe Abbildung 18)





**Abbildung 18: Fusionsgene**

### 3. Kollektiv CN-AML mit *FLT3-ITD* und *NPM1*-Bestimmung n=54

Für die Gruppe der Patienten mit CN-AML bei Erstdiagnose mit gleichzeitig vollständigen molekulargenetischen Analysen für die *NPM1* und *FLT3-ITD* wurden die Stabilitäten und Evolution der genetischen Merkmale gesondert betrachtet. Hierbei handelt es sich um 54 Fälle. (Siehe Abbildung 1)

#### 3.1. Stabilitäten und genetische Evolution

Insgesamt fanden sich bei Erstdiagnose 32/54 (59,3%) Patienten mit *NPM1* und 15/54 (27,7%) mit *FLT3-ITD* Mutation. Die *NPM1* Mutation war zu 93,5% im Rezidiv konstant, während nur 1/22 (4,5%) Patient mit WT bei Erstdiagnose eine *NPM1* Mutation im Rezidiv hinzugewann. Bei den *FLT3-ITD*-Mutationen wurde eine Stabilität von 100% erreicht. In 6/38 (15,8%) Fällen kamen bei WT bei Erstdiagnose im Rezidiv eine weitere *FLT3-ITD* Mutation hinzu. Bei allen Patienten die eine molekulargenetische Mutation hinzugewannen blieb der Karyotyp (CN in Erstdiagnose und Rezidiv) konstant. (Siehe Tabelle 15). In Abbildung 23 (Siehe Anhang) ist ein Überblick über den Mutationsstatus in Abhängigkeit der Zytogenetik dargestellt.

**Tabelle 15: Stabilitäten *FLT3-ITD/NPM1***

	Stabilität im Rezidiv	Verlust im Rezidiv	Hinzugewinn im Rezidiv
<i>NPM1</i>	30/31 (93,5%)	3/32 (6,5%)	1/22 (4,5%)
<i>FLT3-ITD</i>	15/15 (100%)	0/15 (0%)	6/38 (15,8%)

### 3.2. *NPM1/FLT3*-Paare Evolution

Eine Übersicht der Kombinationen der molekulargenetischen Marker *NPM1* und *FLT3-ITD* je nachdem ob der Marker mutiert (mut) oder unverändert (WT „wildtype“) bei Erstdiagnose vorliegt ist in Tabelle 16 einzusehen. Hier zeigt sich in 57,4% (31/54) der Fälle die Marker bei Erstdiagnose denselben Status innehaben (beide WT oder beide mutiert). In 20/54 (37,0%) trat eine *NPM1*-Mutation ohne gleichzeitig mutierte *FLT3-ITD* auf, aber nur in 3/54 (5,6%) wurde eine *FLT3-ITD* Mutation ohne gleichzeitig mutierte *NPM1* gefunden.

**Tabelle 16: Mutationsstatus *NPM1/FLT3-ITD* bei ED**

<i>NPM1/FLT3-ITD (Status)</i>	<i>n=</i>
<i>NPM1</i> (WT)/ <i>FLT3-ITD</i> (WT)	19/54
<i>NPM1</i> (mut)/ <i>FLT3-ITD</i> (WT)	20/54
<i>NPM1</i> (WT)/ <i>FLT3-ITD</i> (mut)	3/54
<i>NPM1</i> (mut)/ <i>FLT3-ITD</i> (mut)	12/54

Die Evolution dieser Paare ist in Abbildungen 19-22 dargestellt. Auch hier zeigt sich eine hohe Stabilität der Marker-Kombinationen von 81,4% (44/54). Die geringste Stabilität zeigt sich bei mutiertem *NPM1* mit unveränderter *FLT3-ITD* (12/20; 60,0%), die größte wenn beide Marker schon bei Erstdiagnose mutiert waren (100%). Insgesamt finden sich im Rezidiv 20 Fälle mit *NPM1* und *FLT3-ITD* Wildetype und 17 bei denen beide Mutationen mutiert sind, so dass in 67,9% der Fälle nun beide Marker denselben Status innehaben. Nur 1 Patient hat eine *FLT3-ITD* Mutation bei *NPM1* WT hinzugewonnen (4/54), während sich die Anzahl der Fälle mit mutiertem *NPM1* bei *FLT3-ITD* WT von 20 auf 13/54 verringert hat. Zusammenfassend lässt sich sagen, dass sich zum einen, wie in der Zytogenetik, eine hohe Stabilität absolut, sowie in Bezug auf die Prognosegruppe zeigt, zum anderen, im Falle einer Veränderung, eine Evolution eher zur genetisch ungünstigen Prognosegruppe erfolgt.

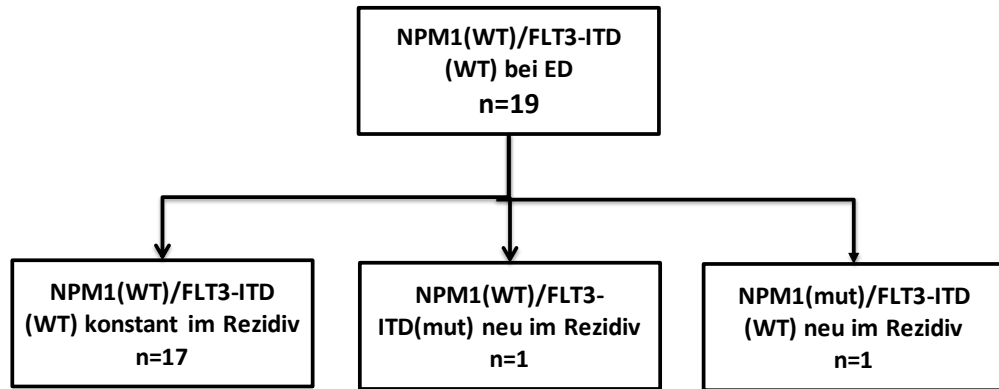


Abbildung 19: Evolution NPM1(WT)/FLT3-ITD(WT)

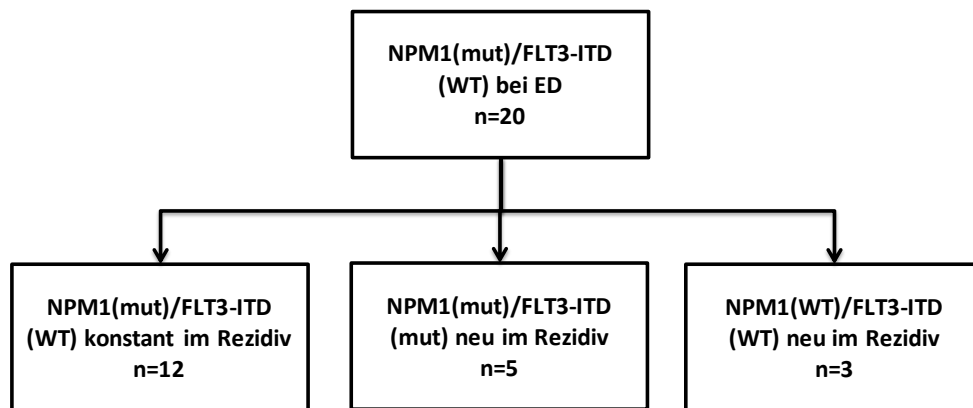


Abbildung 20: Evolution NPM1(mut)/FLT3-ITD(WT)

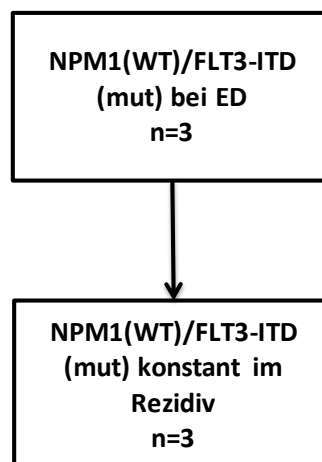
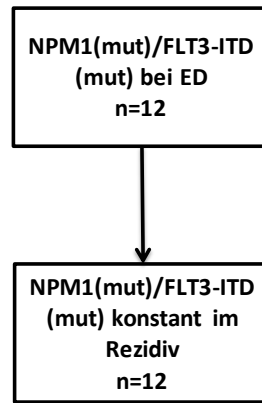


Abbildung 21: Evolution NPM1(WT)/FLT3-ITD(mut)



**Abbildung 22: Evolution NPM1(mut)/FLT3-ITD(mut)**

## VI. DISKUSSION

In der Arbeit wurde zum einen die genetische Stabilität molekulargenetischer und zytogenetischer Marker, zum anderen Therapie und Überleben von AML-Rezidiven betrachtet.

Da es sich um eine retrospektive Studie handelte unterliegt diese den Limitierungen, die dieses Studiendesign mit sich bringt. Im Rahmen des Selektionsprozesses mussten daher zahlreiche Fälle aufgrund unzureichender Dokumentation der Therapien, sowie der unvollständigen genetischen Bestimmungen ausgeschlossen werden. Trotz einer Zahl von 503 AML-Rezidiven, die in der LfL-Datenbank gefunden werden konnten, standen am Ende nur 141 bzw. 135 für die endgültigen Analysen zur Verfügung. Durch diese maßgebliche Reduktion der Fallzahlen wurde zwar die Aussagekraft für einzelne genetische Vergleiche geschwächt, insgesamt aber die Qualität der Gesamtdaten durch eine Re-Evaluierung der klinischen Verläufe und der korrekten Einordnung der genetischen Daten im Rahmen der Erkrankungen deutlich aufgewertet. Durch die nachträgliche Bestimmung von *FLT3-ITD* und *NPM1* zur Vervollständigung von matched-pairs konnte wiederum die Zahl der vergleichbaren Proben und damit die Aussagekraft für die genetischen Stabilitäten wieder gesteigert werden. Da es sich nicht um eine Überlebensstudie handelte und somit die Endpunkte nur für die Patienten vollständig beobachtet werden konnten, die im Klinikum Großhadern verstarben, resultierte eine geringe Zahl von Endpunkten, die die Aussagekraft der Überlebenszeiten einschränkt.

### 1. Patientenkollektiv und Rezidivtherapie

#### 1.1. Patientenkollektiv und RFS

Das Patientenkollektiv der Arbeit ist sehr heterogen. Mit einem medianen Alter von 56 Jahren (21-89), sowie einer annähernd ausgeglichenen Geschlechterverteilung (46,7% männlich), ähnelt das Kollektiv dem der AMLCG-Studie. [65, 66] Dies lässt sich auch dadurch erklären, dass 86/141 Patienten (61,0%) innerhalb dieser Studie behandelt wurden. Das RFS ist mit 8,37 Monaten im Vergleich zu einer prospektiven Studie von Buchner et al. eher gering (12-19 Monate). [65] Hierfür kommen verschiedene Ursachen in Frage. Unter anderem

ist der Anteil der CN-AML ist in unserer Kohorte mit 56% sehr hoch. Bei Buchner et al. handelt es sich nur in 14% um gesicherte CN-AML. In 53% der Fälle sind keine Angaben über den Karyotyp verfügbar. Des Weiteren kann es daran liegen, dass die primäre Selektion von AML-Rezidiven die RFS-Zeiten deutlich verkürzt, da keine primär kurierten Fälle in die Statistik mit eingehen. Auch ist durch das Einschlusskriterium, dass die Patienten zu mindestens einem Zeitpunkt am Klinikum Großhadern behandelt werden mussten, die Behandlung an einem speziellen Zentrum für Leukämien und Knochenmarkstransplantationen zur Voraussetzung geworden, wodurch eine weitergehende Selektion für frühe Rezidive und ungünstige prognostische Grundvoraussetzungen der AML anzunehmen ist.

## **1.2. Rezidivtherapie und Überleben**

Im Rahmen der Rezidivtherapie wurde bei 98/141 (69,5%) Patienten eine kurative Therapie eingeleitet, während 37/141 (26,5%) palliativ behandelt wurden. Von den kurativ behandelten Patienten erhielten 84 (86,6%) eine allogene Stammzelltransplantation und von diesen 55 in Kombination mit einer Chemotherapie (Bridging oder Reinduktion). Dies entspricht auch den aktuellen Empfehlungen, da eine allogene Stammzelltransplantation in Kombination mit einer Chemotherapie aktuell als überlegene Rezidivtherapie gegenüber alleiniger Chemotherapie angesehen wird, auch wenn eine prospektive Studie zum Erfolg der Rezidivtherapie bisher noch aussteht. [12, 26, 67] Auch in dieser Arbeit stellte sich die allogene Stammzelltransplantation überlegen dar. So konnten insgesamt 78,6% eine 2.CR nach Rezidivtherapie erreichen. Hierbei wurde von 71/84 (84,5%) Patienten mit allogener PBSCT eine weitere Remission erreicht, jedoch nur 6/13 (46,1%) der Patienten die nur mit CTX behandelt wurden. Die Überlebenszeiten nach Rezidiv sind aufgrund der fehlenden prospektiven Therapiestudien schwer zu vergleichen. Insgesamt zeigt sich ein verlängertes medianes Überleben nach Rezidiv mit 35,4 Monaten für die Gesamtkohorte, im Vergleich zu Armistad et al. (2,3-11,7 Monate), der in einer retrospektiven Studie das Überleben nach AML-Rezidiv analysierte. [67] Dies liegt zum einen darin begründet, dass sich die Kohorten insbesondere in Bezug auf ihre zytogenetischen Merkmale unterscheiden. So beinhaltet die Kohorte von Armistad et al. 40,8% Patienten innerhalb der intermediären zytogenetischen Prognosegruppe, welche die Gruppe der normalen Karyotypen beinhaltet. Im Vergleich hierzu ist der

Anzahl allein der Patienten mit normalem Karyotyp mit 56,7% (80/141) in unserer Kohorte deutlich höher, so dass hier insgesamt von einem Kollektiv mit besserer Prognose ausgegangen werden kann. Ein weiterer Grund ist, dass es sich bei dieser Arbeit nicht um eine Überlebensstudie handelte und damit eine zu geringe Zahl an Endpunkten erreicht wurde, um eine signifikante Aussagekraft über das Überleben zu erhalten. So konnte für die Kohorte der kurativ behandelten kein Median erstellt werden, da die Mehrheit der gesicherten Endpunkte in der palliativen Subgruppe zu verzeichnen war. Ein ähnliches Bild zeigt sich beim Vergleich der Überlebenszeiten der verschiedenen Rezidivtherapien. Hier konnte kein signifikanter Vorteil einer Strategie gezeigt werden, zum einen wegen der o.g. Problematik, zum anderen wegen der zu geringen Fallzahl der einzelnen Subgruppen.

Im Vergleich der Transplantationssettings mit Duval et al., der die PBSCT als Therapie für rezidierte akute Leukämien und deren Outcome betrachtete, zeigt sich ein ähnliches Bild. So konnte der Anteil an mismatch Transplantationen mit 11,9% im Vergleich zu 14% ähnlich gering gehalten werden. Ebenso ergab sich ein gleichkommender Anteil der Familienspenden (42,9% zu 40%). Diese Parameter gehen bei Duval et al. in den Prognosescore für das Outcome der PBSCT mit ein. Die Konditionierungstherapie scheint dafür hingegen keine Rolle zu spielen. Hier zeigt sich auch ein Unterschied von einer TBI-based Konditionierung in dieser Arbeit mit einem Anteil von 50% im Vergleich zu 63%. [23] Damit zeigt sich, dass das Setting der PBSCTs von AML-Rezidiven am Standort Großhadern mit denen an internationalen Transplantationszentren vergleichbar ist.

Des Weiteren wurde versucht den durch Breems et al eingeführten Score [64] zur Einordnung der Prognose ab 1. Rezidiv anzuwenden und eine externe Validierung desselben durchzuführen. Hierbei fällt die Patientenzahl in der günstigen Gruppe mit 7 Patienten sehr klein aus, während die ungünstige Gruppe den Großteil unseres Kollektivs ausmacht (95/141; 67,4%). Dies lag insbesondere am hohen Alter der Patienten zum Zeitpunkt des Rezidivs, sowie dem kurzen RFS des Kollektivs. Es lässt sich vermuten, dass eine Selektion in Hinblick auf Frührezidive, sowie Hochrisikopatienten durch die Durchführung der Studie an einem speziellen Zentrum erfolgte. Durch die geringe Gruppengröße der günstigen Gruppe, sowie die insgesamt große Zahl der „loss of follow-up“

Patienten konnte kein signifikanter Unterschied im Überleben zwischen den einzelnen Kategorien gezeigt werden, so dass der Score im Rahmen unserer Studie nicht extern validiert werden konnte. Jedoch weist die Tendenz der Überlebenskurven, sowie die Differenz der Mediane zwischen der intermediären (Median=34,5 Monate) und ungünstigen Subgruppe (Median=19,7 Monate) darauf hin, dass der Score ein geeignetes Instrument darstellen könnte, die Prognose ab 1. Rezidiv vorherzusagen.

Insgesamt lässt sich weiterhin keine eindeutige Empfehlung für die optimale Rezidivtherapie aussprechen. Auch wenn sich deutliche Hinweise für einen Vorteil der Kombination aus PBSCT und Reinductions-CTX gegenüber Bridging zeigen, steht der endgültige Beweis und die Durchführung einer prospektiven Studie zum Vergleich der Rezidivtherapien der AML noch aus. [67] Da es sich bei rezidivierter AML bereits um eine ungünstige Grundvoraussetzung handelt, ist hier sicherlich eine PBSCT als Kombinations-Therapie vielversprechender, als alleinige CTX, da diese auch bei AML mit intermediärer und ungünstiger Prognose bei ED bessere Ergebnisse erzielen konnte. [24]

## **2. Genetik und klonale Evolution**

### **2.1. Zytogenetik**

Für die Betrachtung der Zytogenetik wurden nur die Fälle herangezogen, bei denen eine Karyotypen-Analyse bei ED und im Rezidiv durchgeführt wurden, so dass hier nur ein Kollektiv von n=88 Fällen zur Verfügung stand. Bei Erstdiagnose bestand im Kollektiv in 65,9% der Fälle ein normaler Karyotyp. Dies sind etwas mehr als bei Grimwade et al und Byrd et al mit 48% Anteil an CN-AML bei ED auftraten. [33, 37] Ebenso sind in dieser Studie nur 3% einem günstigen, 7% einem ungünstigen und mit 90% der Großteil einem intermediären Karyotyp bei ED zuzuordnen. Damit ist die intermediäre Gruppe weitaus größer als bei Byrd et al (70%), während sowohl die günstige (21%), als auch die ungünstige (9%) Karyotypengruppe geringer bzw. ähnlich groß ausfällt. [33] Der weitaus geringere Anteil an der günstigen Gruppe lässt sich dadurch erklären, dass durch die primäre Auswahl von AML-Rezidiven eine Selektion für ungünstige AML-Genvarianten stattgefunden hat. Dagegen wäre bei der ungünstigen Variante durch die o.g. Selektion eventuell sogar ein höherer Anteil zu erwarten. Dies lässt sich wiederum dadurch erklären, dass ebenfalls die Patienten



ausgeschlossen wurden, die primär keine CR erreichen konnten, also primär therapierefraktär waren, oder erst durch eine PBSCT eine solche erreichen konnten. Hierbei ist anzunehmen, dass ebenso eine Selektion für sehr ungünstige AML-Untergruppen erfolgt ist. Der hohe Anteil an dieser intermediären Gruppe, sowie der hohe Anteil an normalen Karyotypen bestätigt die Relevanz der weiterführenden molekulargenetischen Untersuchungen zur genaueren prognostischen Einordnung.

Bei der Untersuchung der Evolution der Zytogenetik zeigte sich eine sehr hohe Stabilität von 90,9% in Bezug auf die Einordnung in eine zytogenetische Prognosegruppe. Weitere 8% sind einer schlechteren zytogenetischen Gruppe einzuordnen. Diese Evolution kann zum einen auf den ursprünglichen Klon und dessen Tendenz zur zytogenetischen Weiterentwicklung zurückzuführen sein, zum anderen könnte hier die primäre chemotherapeutische Behandlung zu DNA-Schäden und damit zur zytogenetischen Instabilität geführt haben. Diese hohe zytogenetische Stabilität widerspricht den Ergebnissen von Garson et al., der 1989 die Karyotypen von rezidierten AML-Fällen mit dem Karyotyp bei ED verglich und in 39% der Fälle einen komplexeren Karyotyp im Rezidiv vorfand. [68] Dies kann zum einen daran liegen, dass Garson et al. ein anderes zytogenetisches Klassifizierungssystem verwendete und hier 7 verschiedene Untergruppen verwendete, statt drei nach MRC, wie in dieser Studie. Zum anderen wurde bei der Patientenselektion darauf geachtet möglichst vollständige Bestimmungen der molekulargenetischen Marker zu beiden Zeitpunkten zu haben und so konnte möglicherweise eine Selektion für einen hohen Anteil (65,9%) an CN-AML's erfolgen. Ebenso lässt sich die Qualität der Karyotypenanalysen schwer vergleichen, so dass auch hier Gründe für die unterschiedlichen Ergebnisse liegen könnten.

Bei der Erstellung der Überlebenskurven nach ED, bzw. nach Rezidiv unterteilt in die einzelnen zytogenetischen Risikogruppen, ließ sich kein signifikantes Ergebnis erzielen. Dies liegt zum einen an den bereits erwähnten Limitierungen der Endpunkte durch das Studiendesign, zum anderen an den zu kleinen Fallzahlen für die günstige und die ungünstige Gruppe nach MRC. Allerdings scheint sich bei der Betrachtung der Kurven die tendenziell günstige oder auch ungünstige Prognose in die unterschiedlichen Gruppen nach MRC zu bestätigen, vor allem durch das Langzeit-Überleben eines Patienten, der auch im Rezidiv

noch der günstigen Gruppe zuzuordnen ist.

## 2.2. Molekulargenetik

Für die CN-AML's fanden sich in 32/54 (59,3%) Fällen eine *NPM1* und 15/54 (27,8%) Fällen eine *FLT3-ITD* Mutation. Für die Stabilität zeigte sich ein ähnliches Bild für die untersuchten molekulargenetischen Marker mit einer Stabilität von 93,5% für *NPM1*, 100% für *FLT3-ITD*, sowie 83% für die Kombination aus beiden Markern. Die hohe Stabilität der *NPM1* Mutation konnte bereits von Krönke et al mit 91% Stabilität im Rezidiv gezeigt werden, bei einem Vergleich molekulargenetischer matched-pairs für *NPM1* positive Proben in Erstdiagnose und Rezidiv. Die *FLT3-ITD*-Mutation hingegen erreichte in dieser Studie nur eine Stabilität von 75% und ist somit geringer als in dieser Arbeit. Darüber hinaus kamen in 6/38 (15,8%) Fällen mit *FLT3-ITD*-wildtype eine neue Mutation im Rezidiv hinzu, so dass nun in 21/35 (39,6%) Fällen eine mutierter *FLT3*-Status bestand. Dagegen wurde nur 1/22 (4,5%) *NPM1*-Mutation im Rezidiv hinzugewonnen. Diese hohe Zahl an gefundenen *FLT3-ITD*-Mutationen bei Erstdiagnose, sowie der Zugewinn dieser Mutation im Rezidiv sprechen für eine Rolle der *FLT3-ITD* als sogenannte driver mutation. [51]

Bei der Betrachtung der *FLT3-ITD/NPM1*-Kombinationen lässt sich, analog zur zytogenetischen Betrachtung, eine hohe Stabilität aufzeigen, aber im Falle einer Evolution die Tendenz zur schlechteren Prognosegruppe beobachten. Gale et al. ordnete den Kombinationen drei verschiedene Risikogruppen zu, so dass *FLT3-ITD*(-)/*NPM1*(+) der günstigen, *FLT3-ITD*(+)/*NPM1*(-) der ungünstigen und derselbe Status beider Mutationen einer intermediären Prognosegruppe entspricht. [52] Angewendet auf diese Studie bleiben hier 3/3 (100%) Patienten der ungünstigen Gruppe und nur 12/20 (60,0%) der günstigen Gruppe konstant, während im Rezidiv 8/20 (40,0%) der intermediären Gruppe zuzuordnen sind. Von den 31 Fällen, die den intermediären Typen zugeordnet sind, bleiben 29 (93,5%) konstant und nur jeweils ein Fall ist im Rezidiv jeweils der günstigen und ungünstigen Gruppe zuzuordnen. Auch diese Ergebnisse lassen sich in Einklang mit der klonalen Evolution bringen (siehe VI/2.3).

### **2.3. Klonale Evolution**

Die hohe Stabilität der zytogenetischen und molekulargenetischen Veränderungen, teilweise verbunden mit einem Hinzugewinn weiterer Mutationen unterstützt die von Ding et al. propagierte These der klonalen Evolution. Sie besagt, dass für die Entstehung eines Rezidivs entweder eine Krebsstammzelle weitere Mutationen hinzugewinnt, sich so weiterentwickeln kann und zum Rezidiv-Klon wird, oder ein Sub-Klon der ursprünglichen Stammzelle, der die primäre Chemotherapie überlebt, durch den Hinzugewinn weiterer Mutationen das Rezidiv verursacht. [5] In beiden Fällen sind die ursprünglichen Mutationen im Rezidiv stabil. Auch die Ergebnisse von Parkin et al., der das genetische Profil von matched pairs bei Erstdiagnose und Rezidiv untersuchte und daraus folgerte, dass die inkomplette Eradikation der AML-Stammzellen für die Entstehung eines Rezidivs verantwortlich sind, können durch die oben genannten Ergebnisse gestützt werden. [6] Insgesamt lässt die sehr hohe Stabilität der untersuchten genetischen Veränderungen vermuten, dass weitere Mutationen oder andere Mechanismen die Zellen mit Resistenzmechanismen gegen die primäre Chemotherapie ausstatten. Um diese zu identifizieren könnten in Zukunft Analysen von ganzen Genomen, sowie Genexpressions- und Methylierungsprofile hilfreich sein.

## VII. ZUSAMMENFASSUNG

Die rezidierte akute myeloische Leukämie stellt nach wie vor eine Erkrankung mit schlechter Prognose dar. Um die Hintergründe der Entstehung von Rezidiven zu verstehen und die Therapiemöglichkeiten zu verbessern, scheinen die Analysen von zytogenetischen, sowie molekulargenetischen Veränderungen der Leukämie von entscheidender Bedeutung zu sein.

Um die aktuelle Therapie zu evaluieren, wurde im ersten Teil der Arbeit die Rezidivtherapie von 141 Patienten mit rezidivierter AML am Standort Klinikum Großhadern betrachtet und das Überleben der Patienten beobachtet. Hierbei zeigte sich zum einen die Relevanz der allogenen PBSCT in Kombination mit einer Chemotherapie als bisher wirksamste Therapieoption. Dennoch bestätigte sich die schlechte Prognose der rezidierten AML und damit die Notwendigkeit von randomisierten klinischen Studien zur Evaluierung der optimalen Rezidivtherapie.

In einem zweiten Teil der Arbeit wurden, mit der Absicht die Rolle der klonalen Evolution für AML Rezidive zu evaluieren, die zytogenetischen Merkmale in 88, sowie die molekulargenetischen Merkmale in 54 Fällen bei Erstdiagnose und Rezidiv erfasst und verglichen. Hierbei zeigte sich eine sehr hohe Stabilität, sowohl für zytogenetische, als auch für molekulargenetische Veränderungen, die im Rahmen von Untersuchungen standardmäßig erfasst werden. Diese Daten stützen zum einen die These der klonalen Evolution, zum anderen deuten sie darauf hin, dass weitere unbekannte Veränderungen zur Entstehung eines Rezidivs und zur Entwicklung von Resistenzen gegen die primäre Chemotherapie beitragen.

## VIII. LITERATURVERZEICHNIS

1. Xu, J., K.D. Kochanek, S.L. Murphy, and E. Arias, *Mortality in the United States, 2012*. NCHS Data Brief, 2014(168): p. 1-8.
2. Knudson, A.G., Jr., *Mutation and cancer: statistical study of retinoblastoma*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1971. **68**(4): p. 820-3.
3. Reilly, J.T., *Pathogenesis of acute myeloid leukaemia and inv(16)(p13;q22): a paradigm for understanding leukaemogenesis?* Br J Haematol, 2005. **128**(1): p. 18-34.
4. Nowell, P.C., *The clonal evolution of tumor cell populations*. Science, 1976. **194**(4260): p. 23-8.
5. Ding, L., T.J. Ley, D.E. Larson, C.A. Miller, D.C. Koboldt, J.S. Welch, J.K. Ritchey, M.A. Young, T. Lamprecht, M.D. McLellan, J.F. McMichael, J.W. Wallis, C. Lu, D. Shen, C.C. Harris, D.J. Dooling, R.S. Fulton, L.L. Fulton, K. Chen, H. Schmidt, J. Kalicki-Veizer, V.J. Magrini, L. Cook, S.D. McGrath, T.L. Vickery, M.C. Wendl, S. Heath, M.A. Watson, D.C. Link, M.H. Tomasson, W.D. Shannon, J.E. Payton, S. Kulkarni, P. Westervelt, M.J. Walter, T.A. Graubert, E.R. Mardis, R.K. Wilson, and J.F. DiPersio, *Clonal evolution in relapsed acute myeloid leukaemia revealed by whole-genome sequencing*. Nature, 2012. **481**(7382): p. 506-10.
6. Parkin, B., P. Ouillette, Y. Li, J. Keller, C. Lam, D. Roulston, C. Li, K. Shedden, and S.N. Malek, *Clonal evolution and devolution after chemotherapy in adult acute myelogenous leukemia*. Blood, 2013. **121**(2): p. 369-77.
7. Hiddemann, W., K. Spiekermann, C. Buske, M. Feuring-Buske, J. Braess, T. Haferlach, C. Schoch, W. Kern, S. Schnittger, W. Berdel, B. Wormann, A. Heinecke, C. Sauerland, T. Buchner, and A.M.L.C.G. German, *Towards a pathogenesis-oriented therapy of acute myeloid leukemia*. Crit Rev Oncol Hematol, 2005. **56**(2): p. 235-45.

8. Yamamoto, J.F. and M.T. Goodman, *Patterns of leukemia incidence in the United States by subtype and demographic characteristics, 1997-2002*. Cancer Causes Control, 2008. **19**(4): p. 379-90.
9. Smith, A., D. Howell, R. Patmore, A. Jack, and E. Roman, *Incidence of haematological malignancy by sub-type: a report from the Haematological Malignancy Research Network*. Br J Cancer, 2011. **105**(11): p. 1684-92.
10. Siegel, R., D. Naishadham, and A. Jemal, *Cancer statistics, 2012*. CA Cancer J Clin, 2012. **62**(1): p. 10-29.
11. Estey, E. and H. Dohner, *Acute myeloid leukaemia*. Lancet, 2006. **368**(9550): p. 1894-907.
12. Dohner, H., E.H. Estey, S. Amadori, F.R. Appelbaum, T. Buchner, A.K. Burnett, H. Dombret, P. Fenaux, D. Grimwade, R.A. Larson, F. Lo-Coco, T. Naoe, D. Niederwieser, G.J. Ossenkoppele, M.A. Sanz, J. Sierra, M.S. Tallman, B. Lowenberg, C.D. Bloomfield, and L. European, *Diagnosis and management of acute myeloid leukemia in adults: recommendations from an international expert panel, on behalf of the European LeukemiaNet*. Blood, 2010. **115**(3): p. 453-74.
13. Cheson, B.D., J.M. Bennett, K.J. Kopecky, T. Buchner, C.L. Willman, E.H. Estey, C.A. Schiffer, H. Doehner, M.S. Tallman, T.A. Lister, F. Lo-Coco, R. Willemze, A. Biondi, W. Hiddemann, R.A. Larson, B. Lowenberg, M.A. Sanz, D.R. Head, R. Ohno, C.D. Bloomfield, S.o.R.C.T.O. International Working Group for Diagnosis, and L. Reporting Standards for Therapeutic Trials in Acute Myeloid, *Revised recommendations of the International Working Group for Diagnosis, Standardization of Response Criteria, Treatment Outcomes, and Reporting Standards for Therapeutic Trials in Acute Myeloid Leukemia*. J Clin Oncol, 2003. **21**(24): p. 4642-9.
14. Vardiman, J.W., N.L. Harris, and R.D. Brunning, *The World Health Organization (WHO) classification of the myeloid neoplasms*. Blood, 2002. **100**(7): p. 2292-302.

15. Hiddemann, W. and T. Buchner, *Treatment strategies in acute myeloid leukemia (AML). B. Second line treatment*. Blut, 1990. **60**(3): p. 163-71.
16. Lowenberg, B., J.D. Griffin, and M.S. Tallman, *Acute myeloid leukemia and acute promyelocytic leukemia*. Hematology Am Soc Hematol Educ Program, 2003: p. 82-101.
17. O'Donnell, M.R., M.S. Tallman, C.N. Abboud, J.K. Altman, F.R. Appelbaum, D.A. Arber, E. Attar, U. Borate, S.E. Coutre, L.E. Damon, J. Lancet, L.J. Maness, G. Marcucci, M.G. Martin, M.M. Millenson, J.O. Moore, F. Ravandi, P.J. Shami, B.D. Smith, R.M. Stone, S.A. Strickland, E.S. Wang, K.M. Gregory, M. Naganuma, and N. National Comprehensive Cancer, *Acute myeloid leukemia, version 2.2013*. J Natl Compr Canc Netw, 2013. **11**(9): p. 1047-55.
18. Sanz, M.A., D. Grimwade, M.S. Tallman, B. Lowenberg, P. Fenaux, E.H. Estey, T. Naoe, E. Lengfelder, T. Buchner, H. Dohner, A.K. Burnett, and F. Lo-Coco, *Management of acute promyelocytic leukemia: recommendations from an expert panel on behalf of the European LeukemiaNet*. Blood, 2009. **113**(9): p. 1875-91.
19. Dickinson, A.M., J. Norden, S. Li, I. Hromadnikova, C. Schmid, H. Schmetzer, and H. Jochem-Kolb, *Graft-versus-Leukemia Effect Following Hematopoietic Stem Cell Transplantation for Leukemia*. Front Immunol, 2017. **8**: p. 496.
20. Champlin, R.E., N. Schmitz, M.M. Horowitz, B. Chapuis, R. Chopra, J.J. Cornelissen, R.P. Gale, J.M. Goldman, F.R. Loberiza, Jr., B. Hertenstein, J.P. Klein, E. Montserrat, M.J. Zhang, O. Ringden, S.C. Tomany, P.A. Rowlings, M.E. Van Hoef, and A. Gratwohl, *Blood stem cells compared with bone marrow as a source of hematopoietic cells for allogeneic transplantation. IBMTR Histocompatibility and Stem Cell Sources Working Committee and the European Group for Blood and Marrow Transplantation (EBMT)*. Blood, 2000. **95**(12): p. 3702-9.

21. Bacigalupo, A., V. Vitale, R. Corvo, S. Barra, T. Lamparelli, F. Gualandi, N. Mordini, G. Berisso, S. Bregante, A.M. Raiola, M.T. Van Lint, and F. Frassoni, *The combined effect of total body irradiation (TBI) and cyclosporin A (CyA) on the risk of relapse in patients with acute myeloid leukaemia undergoing allogeneic bone marrow transplantation*. Br J Haematol, 2000. **108**(1): p. 99-104.
22. Murata, M., T. Nishida, M. Haneda, T. Kanie, H. Taji, H. Iida, R. Suzuki, M. Hamaguchi, S. Minami, and Y. Kodera, *A new preconditioning regimen with melphalan, busulphan and total body irradiation followed by low-dose immunosuppressant in allogeneic haemopoietic stem cell transplantation*. Br J Haematol, 1999. **105**(3): p. 799-802.
23. Duval, M., J.P. Klein, W. He, J.Y. Cahn, M. Cairo, B.M. Camitta, R. Kamble, E. Copelan, M. de Lima, V. Gupta, A. Keating, H.M. Lazarus, M.R. Litzow, D.I. Marks, R.T. Maziarz, D.A. Rizzieri, G. Schiller, K.R. Schultz, M.S. Tallman, and D. Weisdorf, *Hematopoietic stem-cell transplantation for acute leukemia in relapse or primary induction failure*. J Clin Oncol, 2010. **28**(23): p. 3730-8.
24. Koreth, J., R. Schlenk, K.J. Kopeccky, S. Honda, J. Sierra, B.J. Djulbegovic, M. Wadleigh, D.J. DeAngelo, R.M. Stone, H. Sakamaki, F.R. Appelbaum, H. Dohner, J.H. Antin, R.J. Soiffer, and C. Cutler, *Allogeneic stem cell transplantation for acute myeloid leukemia in first complete remission: systematic review and meta-analysis of prospective clinical trials*. JAMA, 2009. **301**(22): p. 2349-61.
25. Estey, E.H., *Acute myeloid leukemia: 2013 update on risk-stratification and management*. Am J Hematol, 2013. **88**(4): p. 318-27.
26. Ferrara, F., S. Palmieri, and G. Mele, *Prognostic factors and therapeutic options for relapsed or refractory acute myeloid leukemia*. Haematologica, 2004. **89**(8): p. 998-1008.
27. Burnett, A.K., A.H. Goldstone, R.M. Stevens, I.M. Hann, J.K. Rees, R.G.



Gray, and K. Wheatley, *Randomised comparison of addition of autologous bone-marrow transplantation to intensive chemotherapy for acute myeloid leukaemia in first remission: results of MRC AML 10 trial. UK Medical Research Council Adult and Children's Leukaemia Working Parties*. Lancet, 1998. **351**(9104): p. 700-8.

28. Suciu, S., F. Mandelli, T. de Witte, R. Zittoun, E. Gallo, B. Labar, G. De Rosa, A. Belhabri, R. Giustolisi, R. Delarue, V. Liso, S. Mirto, G. Leone, J.H. Bourhis, G. Fioritoni, U. Jehn, S. Amadori, P. Fazi, A. Hagemeijer, R. Willemze, EORTC, and G.L. Groups, *Allogeneic compared with autologous stem cell transplantation in the treatment of patients younger than 46 years with acute myeloid leukemia (AML) in first complete remission (CR1): an intention-to-treat analysis of the EORTC/GIMEMAAML-10 trial*. Blood, 2003. **102**(4): p. 1232-40.

29. Dinner, S.N., F.J. Giles, and J.K. Altman, *New strategies for relapsed acute myeloid leukemia: fertile ground for translational research*. Curr Opin Hematol, 2014. **21**(2): p. 79-86.

30. Ravandi, F., *Relapsed acute myeloid leukemia: why is there no standard of care?* Best Pract Res Clin Haematol, 2013. **26**(3): p. 253-9.

31. Shipley, J.L. and J.N. Butera, *Acute myelogenous leukemia*. Exp Hematol, 2009. **37**(6): p. 649-58.

32. Appelbaum, F.R., H. Gundacker, D.R. Head, M.L. Slovak, C.L. Willman, J.E. Godwin, J.E. Anderson, and S.H. Petersdorf, *Age and acute myeloid leukemia*. Blood, 2006. **107**(9): p. 3481-5.

33. Byrd, J.C., K. Mrozek, R.K. Dodge, A.J. Carroll, C.G. Edwards, D.C. Arthur, M.J. Pettenati, S.R. Patil, K.W. Rao, M.S. Watson, P.R. Koduru, J.O. Moore, R.M. Stone, R.J. Mayer, E.J. Feldman, F.R. Davey, C.A. Schiffer, R.A. Larson, C.D. Bloomfield, Cancer, and B. Leukemia Group, *Pretreatment cytogenetic abnormalities are predictive of induction success, cumulative incidence of relapse, and overall survival in adult patients with de novo acute*

*myeloid leukemia: results from Cancer and Leukemia Group B (CALGB 8461)*. Blood, 2002. **100**(13): p. 4325-36.

34. Grimwade, D., R.K. Hills, A.V. Moorman, H. Walker, S. Chatters, A.H. Goldstone, K. Wheatley, C.J. Harrison, A.K. Burnett, and G. National Cancer Research Institute Adult Leukaemia Working, *Refinement of cytogenetic classification in acute myeloid leukemia: determination of prognostic significance of rare recurring chromosomal abnormalities among 5876 younger adult patients treated in the United Kingdom Medical Research Council trials*. Blood, 2010. **116**(3): p. 354-65.

35. Rollig, C., M. Bornhauser, C. Thiede, F. Taube, M. Kramer, B. Mohr, W. Aulitzky, H. Bodenstein, H.J. Tischler, R. Stuhlmann, U. Schuler, F. Stolz, M. von Bonin, H. Wandt, K. Schafer-Eckart, M. Schaich, and G. Ehninger, *Long-term prognosis of acute myeloid leukemia according to the new genetic risk classification of the European LeukemiaNet recommendations: evaluation of the proposed reporting system*. J Clin Oncol, 2011. **29**(20): p. 2758-65.

36. Mrozek, K., N.A. Heerema, and C.D. Bloomfield, *Cytogenetics in acute leukemia*. Blood Rev, 2004. **18**(2): p. 115-36.

37. Grimwade, D., H. Walker, G. Harrison, F. Oliver, S. Chatters, C.J. Harrison, K. Wheatley, A.K. Burnett, A.H. Goldstone, and P. Medical Research Council Adult Leukemia Working, *The predictive value of hierarchical cytogenetic classification in older adults with acute myeloid leukemia (AML): analysis of 1065 patients entered into the United Kingdom Medical Research Council AML11 trial*. Blood, 2001. **98**(5): p. 1312-20.

38. Kozu, T., H. Miyoshi, K. Shimizu, N. Maseki, Y. Kaneko, H. Asou, N. Kamada, and M. Ohki, *Junctions of the AML1/MTG8(ETO) fusion are constant in t(8;21) acute myeloid leukemia detected by reverse transcription polymerase chain reaction*. Blood, 1993. **82**(4): p. 1270-6.

39. Nucifora, G. and J.D. Rowley, *AML1 and the 8;21 and 3;21 translocations*

*in acute and chronic myeloid leukemia*. Blood, 1995. **86**(1): p. 1-14.

40. Reikvam, H., K.J. Hatfield, A.O. Kittang, R. Hovland, and O. Bruserud, *Acute myeloid leukemia with the t(8;21) translocation: clinical consequences and biological implications*. J Biomed Biotechnol, 2011. **2011**: p. 104631.

41. Larson, R.A., K. Kondo, J.W. Vardiman, A.E. Butler, H.M. Golomb, and J.D. Rowley, *Evidence for a 15;17 translocation in every patient with acute promyelocytic leukemia*. Am J Med, 1984. **76**(5): p. 827-41.

42. Melnick, A. and J.D. Licht, *Deconstructing a disease: RARalpha, its fusion partners, and their roles in the pathogenesis of acute promyelocytic leukemia*. Blood, 1999. **93**(10): p. 3167-215.

43. Patel, J.P., M. Gonen, M.E. Figueroa, H. Fernandez, Z. Sun, J. Racevskis, P. Van Vlierberghe, I. Dolgalev, S. Thomas, O. Aminova, K. Huberman, J. Cheng, A. Viale, N.D. Socci, A. Heguy, A. Cherry, G. Vance, R.R. Higgins, R.P. Ketterling, R.E. Gallagher, M. Litzow, M.R. van den Brink, H.M. Lazarus, J.M. Rowe, S. Luger, A. Ferrando, E. Paietta, M.S. Tallman, A. Melnick, O. Abdel-Wahab, and R.L. Levine, *Prognostic relevance of integrated genetic profiling in acute myeloid leukemia*. N Engl J Med, 2012. **366**(12): p. 1079-89.

44. Falini, B., C. Mecucci, E. Tiacci, M. Alcalay, R. Rosati, L. Pasqualucci, R. La Starza, D. Diverio, E. Colombo, A. Santucci, B. Bigerna, R. Pacini, A. Pucciarini, A. Liso, M. Vignetti, P. Fazi, N. Meani, V. Pettirossi, G. Saglio, F. Mandelli, F. Lo-Coco, P.G. Pelicci, M.F. Martelli, and G.A.L.W. Party, *Cytoplasmic nucleophosmin in acute myelogenous leukemia with a normal karyotype*. N Engl J Med, 2005. **352**(3): p. 254-66.

45. Liu, Y., P. He, F. Liu, L. Shi, H. Zhu, J. Zhao, Y. Wang, X. Cheng, and M. Zhang, *Prognostic significance of NPM1 mutations in acute myeloid leukemia: A meta-analysis*. Mol Clin Oncol, 2014. **2**(2): p. 275-281.

46. Palmisano, M., T. Grafone, E. Ottaviani, N. Testoni, M. Baccarani, and G.

Martinelli, *NPM1 mutations are more stable than FLT3 mutations during the course of disease in patients with acute myeloid leukemia*. Haematologica, 2007. **92**(9): p. 1268-9.

47. Mrozek, K., H. Dohner, and C.D. Bloomfield, *Influence of new molecular prognostic markers in patients with karyotypically normal acute myeloid leukemia: recent advances*. Curr Opin Hematol, 2007. **14**(2): p. 106-14.

48. Verhaak, R.G., C.S. Goudswaard, W. van Putten, M.A. Bijl, M.A. Sanders, W. Hugen, A.G. Uitterlinden, C.A. Erpelinck, R. Delwel, B. Lowenberg, and P.J. Valk, *Mutations in nucleophosmin (NPM1) in acute myeloid leukemia (AML): association with other gene abnormalities and previously established gene expression signatures and their favorable prognostic significance*. Blood, 2005. **106**(12): p. 3747-54.

49. Kottaridis, P.D., R.E. Gale, and D.C. Linch, *Prognostic implications of the presence of FLT3 mutations in patients with acute myeloid leukemia*. Leuk Lymphoma, 2003. **44**(6): p. 905-13.

50. Whitman, S.P., K.J. Archer, L. Feng, C. Baldus, B. Becknell, B.D. Carlson, A.J. Carroll, K. Mrozek, J.W. Vardiman, S.L. George, J.E. Kolitz, R.A. Larson, C.D. Bloomfield, and M.A. Caligiuri, *Absence of the wild-type allele predicts poor prognosis in adult de novo acute myeloid leukemia with normal cytogenetics and the internal tandem duplication of FLT3: a cancer and leukemia group B study*. Cancer Res, 2001. **61**(19): p. 7233-9.

51. Cloos, J., B.F. Goemans, C.J. Hess, J.W. van Oostveen, Q. Waisfisz, S. Corthals, D. de Lange, N. Boeckx, K. Hahlen, D. Reinhardt, U. Creutzig, G.J. Schuurhuis, M. Zwaan Ch, and G.J. Kaspers, *Stability and prognostic influence of FLT3 mutations in paired initial and relapsed AML samples*. Leukemia, 2006. **20**(7): p. 1217-20.

52. Gale, R.E., C. Green, C. Allen, A.J. Mead, A.K. Burnett, R.K. Hills, D.C. Linch, and P. Medical Research Council Adult Leukaemia Working, *The impact*

of *FLT3* internal tandem duplication mutant level, number, size, and interaction with *NPM1* mutations in a large cohort of young adult patients with acute myeloid leukemia. *Blood*, 2008. **111**(5): p. 2776-84.

53. Schnittger, S., C. Schoch, W. Kern, C. Mecucci, C. Tschulik, M.F. Martelli, T. Haferlach, W. Hiddemann, and B. Falini, *Nucleophosmin gene mutations are predictors of favorable prognosis in acute myelogenous leukemia with a normal karyotype*. *Blood*, 2005. **106**(12): p. 3733-9.

54. Mead, A.J., D.C. Linch, R.K. Hills, K. Wheatley, A.K. Burnett, and R.E. Gale, *FLT3 tyrosine kinase domain mutations are biologically distinct from and have a significantly more favorable prognosis than FLT3 internal tandem duplications in patients with acute myeloid leukemia*. *Blood*, 2007. **110**(4): p. 1262-70.

55. Yanada, M., K. Matsuo, T. Suzuki, H. Kiyoi, and T. Naoe, *Prognostic significance of FLT3 internal tandem duplication and tyrosine kinase domain mutations for acute myeloid leukemia: a meta-analysis*. *Leukemia*, 2005. **19**(8): p. 1345-9.

56. Whitman, S.P., A.S. Ruppert, M.D. Radmacher, K. Mrozek, P. Paschka, C. Langer, C.D. Baldus, J. Wen, F. Racke, B.L. Powell, J.E. Kolitz, R.A. Larson, M.A. Caligiuri, G. Marcucci, and C.D. Bloomfield, *FLT3 D835/I836 mutations are associated with poor disease-free survival and a distinct gene-expression signature among younger adults with de novo cytogenetically normal acute myeloid leukemia lacking FLT3 internal tandem duplications*. *Blood*, 2008. **111**(3): p. 1552-9.

57. Bacher, U., C. Haferlach, W. Kern, T. Haferlach, and S. Schnittger, *Prognostic relevance of FLT3-TKD mutations in AML: the combination matters--an analysis of 3082 patients*. *Blood*, 2008. **111**(5): p. 2527-37.

58. Caligiuri, M.A., S.A. Schichman, M.P. Strout, K. Mrozek, M.R. Baer, S.R. Frankel, M. Barcos, G.P. Herzig, C.M. Croce, and C.D. Bloomfield, *Molecular*

*rearrangement of the ALL-1 gene in acute myeloid leukemia without cytogenetic evidence of 11q23 chromosomal translocations.* Cancer Res, 1994. **54**(2): p. 370-3.

59. Schlenk, R.F., K. Dohner, J. Krauter, S. Frohling, A. Corbacioglu, L. Bullinger, M. Habdank, D. Spath, M. Morgan, A. Benner, B. Schlegelberger, G. Heil, A. Ganser, H. Dohner, and G. German-Austrian Acute Myeloid Leukemia Study, *Mutations and treatment outcome in cytogenetically normal acute myeloid leukemia.* N Engl J Med, 2008. **358**(18): p. 1909-18.

60. Grossmann, V., S. Schnittger, A. Kohlmann, C. Eder, A. Roller, F. Dicker, C. Schmid, C.M. Wendtner, P. Staib, H. Serve, K.A. Kreuzer, W. Kern, T. Haferlach, and C. Haferlach, *A novel hierarchical prognostic model of AML solely based on molecular mutations.* Blood, 2012. **120**(15): p. 2963-72.

61. Kronke, J., L. Bullinger, V. Teleanu, F. Tschurtz, V.I. Gaidzik, M.W. Kuhn, F.G. Rucker, K. Holzmann, P. Paschka, S. Kapp-Schworer, D. Spath, T. Kindler, M. Schittenhelm, J. Krauter, A. Ganser, G. Gohring, B. Schlegelberger, R.F. Schlenk, H. Dohner, and K. Dohner, *Clonal evolution in relapsed NPM1-mutated acute myeloid leukemia.* Blood, 2013. **122**(1): p. 100-8.

62. Bennett, J.M., D. Catovsky, M.T. Daniel, G. Flandrin, D.A. Galton, H.R. Gralnick, and C. Sultan, *Proposals for the classification of the acute leukaemias. French-American-British (FAB) co-operative group.* Br J Haematol, 1976. **33**(4): p. 451-8.

63. Vardiman, J.W., J. Thiele, D.A. Arber, R.D. Brunning, M.J. Borowitz, A. Porwit, N.L. Harris, M.M. Le Beau, E. Hellstrom-Lindberg, A. Tefferi, and C.D. Bloomfield, *The 2008 revision of the World Health Organization (WHO) classification of myeloid neoplasms and acute leukemia: rationale and important changes.* Blood, 2009. **114**(5): p. 937-51.

64. Breems, D.A., W.L. Van Putten, P.C. Huijgens, G.J. Ossenkoppele, G.E. Verhoef, L.F. Verdonck, E. Vellenga, G.E. De Greef, E. Jacky, J. Van der Lelie,

M.A. Boogaerts, and B. Lowenberg, *Prognostic index for adult patients with acute myeloid leukemia in first relapse*. J Clin Oncol, 2005. **23**(9): p. 1969-78.

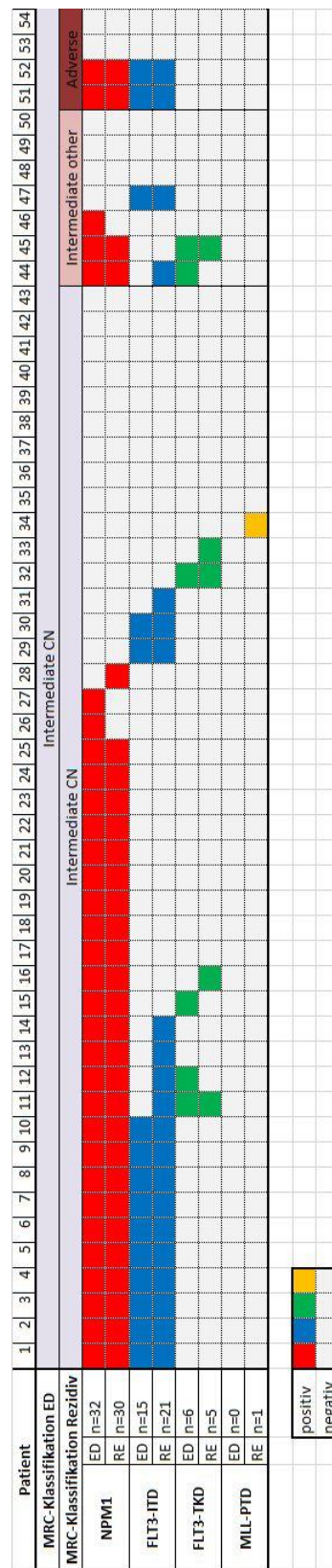
65. Buchner, T., W. Hiddemann, W.E. Berdel, B. Wormann, C. Schoch, C. Fonatsch, H. Loffler, T. Haferlach, W.D. Ludwig, G. Maschmeyer, P. Staib, C. Aul, A. Gruneisen, E. Lengfelder, N. Frickhofen, W. Kern, H.L. Serve, R.M. Mesters, M.C. Sauerland, A. Heinecke, and A.M.L.C.G. German, *6-Thioguanine, cytarabine, and daunorubicin (TAD) and high-dose cytarabine and mitoxantrone (HAM) for induction, TAD for consolidation, and either prolonged maintenance by reduced monthly TAD or TAD-HAM-TAD and one course of intensive consolidation by sequential HAM in adult patients at all ages with de novo acute myeloid leukemia (AML): a randomized trial of the German AML Cooperative Group*. J Clin Oncol, 2003. **21**(24): p. 4496-504.

66. Buchner, T., W. Hiddemann, B. Wormann, H. Loffler, W. Gassmann, T. Haferlach, C. Fonatsch, D. Haase, C. Schoch, D. Hossfeld, E. Lengfelder, C. Aul, A. Heyll, G. Maschmeyer, W.D. Ludwig, M.C. Sauerland, and A. Heinecke, *Double induction strategy for acute myeloid leukemia: the effect of high-dose cytarabine with mitoxantrone instead of standard-dose cytarabine with daunorubicin and 6-thioguanine: a randomized trial by the German AML Cooperative Group*. Blood, 1999. **93**(12): p. 4116-24.

67. Armistead, P.M., M. de Lima, S. Pierce, W. Qiao, X. Wang, P.F. Thall, S. Giralt, F. Ravandi, H. Kantarjian, R. Champlin, and E. Estey, *Quantifying the survival benefit for allogeneic hematopoietic stem cell transplantation in relapsed acute myelogenous leukemia*. Biol Blood Marrow Transplant, 2009. **15**(11): p. 1431-8.

68. Garson, O.M., A. Hagemeijer, M. Sakurai, B.R. Reeves, G.J. Swansbury, G.J. Williams, G. Alimena, D.C. Arthur, R. Berger, A. de la Chapelle, and et al., *Cytogenetic studies of 103 patients with acute myelogenous leukemia in relapse*. Cancer Genet Cytogenet, 1989. **40**(2): p. 187-202.

## IX. ANHANG



### Abbildung 23: Heat map



## X. ABBILDUNGS- UND TABELLENVERZEICHNIS

### Abbildungsverzeichnis:

<i>Abbildung 1: Patientenselektion .....</i>	<i>31</i>
<i>Abbildung 2: Rezidivfreies Überleben (CR1-Rezidiv) .....</i>	<i>34</i>
<i>Abbildung 3: Art der Therapie .....</i>	<i>35</i>
<i>Abbildung 4: Kurative Rezidivtherapie Übersicht .....</i>	<i>36</i>
<i>Abbildung 5: Erfolg Rezidivtherapie .....</i>	<i>39</i>
<i>Abbildung 6: Gesamtüberleben ab ED .....</i>	<i>40</i>
<i>Abbildung 7: Überleben ab ED bei kurativer Rezidivtherapie .....</i>	<i>40</i>
<i>Abbildung 8: Überleben nach 1. Rezidiv .....</i>	<i>41</i>
<i>Abbildung 9: Überleben nach Breems-Kategorie ab 1. Rezidiv .....</i>	<i>42</i>
<i>Abbildung 10: Übersicht Mutationen .....</i>	<i>43</i>
<i>Abbildung 11: Bestimmungen Zytogenetik .....</i>	<i>44</i>
<i>Abbildung 12: MRC bei ED .....</i>	<i>45</i>
<i>Abbildung 13: Evolution Zytogenetik ED-Rezidiv (Günstig) .....</i>	<i>46</i>
<i>Abbildung 14: Evolution Zytogenetik ED-Rezidiv (Intermediär) .....</i>	<i>46</i>
<i>Abbildung 15: Evolution Zytogenetik ED-Rezidiv (Ungünstig) .....</i>	<i>46</i>
<i>Abbildung 16: Überleben nach Zytogenetik (ED-Tod) .....</i>	<i>47</i>
<i>Abbildung 17: Überleben nach Zytogenetik (Rezidiv-Tod) .....</i>	<i>48</i>
<i>Abbildung 18: Fusionsgene .....</i>	<i>49</i>
<i>Abbildung 19: Evolution NPM1(WT)/FLT3-ITD(WT) .....</i>	<i>51</i>
<i>Abbildung 20: Evolution NPM1(mut)/FLT3-ITD(WT) .....</i>	<i>51</i>
<i>Abbildung 21: Evolution NPM1(WT)/FLT3-ITD(mut) .....</i>	<i>51</i>
<i>Abbildung 22: Evolution NPM1(mut)/FLT3-ITD(mut) .....</i>	<i>52</i>
<i>Abbildung 23: Heat map .....</i>	<i>72</i>

### Tabellenverzeichnis:

<i>Tabelle 1: FAB-Klassifikation .....</i>	<i>20</i>
<i>Tabelle 2: WHO-Klassifikation .....</i>	<i>20</i>
<i>Tabelle 3: MRC-Klassifikation .....</i>	<i>21</i>
<i>Tabelle 4: Breems-Score .....</i>	<i>22</i>
<i>Tabelle 5: Datenbank - Persönliche Daten .....</i>	<i>26</i>

---

<i>Tabelle 6: Datenbank - Interne Daten .....</i>	<i>26</i>
<i>Tabelle 7: Datenbank -Genetik.....</i>	<i>27</i>
<i>Tabelle 8: Follow-Up - Interne Daten .....</i>	<i>29</i>
<i>Tabelle 9: Follow-Up - Rezidivtherapie .....</i>	<i>29</i>
<i>Tabelle 10: Patientencharakterisitka.....</i>	<i>32</i>
<i>Tabelle 11: Therapie in Studien.....</i>	<i>33</i>
<i>Tabelle 12: Kurative Chemotherapien.....</i>	<i>37</i>
<i>Tabelle 13: Tranplantationscharakteristika (n=84).....</i>	<i>38</i>
<i>Tabelle 14: Breems Score Auswertung .....</i>	<i>41</i>
<i>Tabelle 15: Stabilitäten FLT3-ITD/NPM1.....</i>	<i>50</i>
<i>Tabelle 16: Mutationsstatus NPM1/FLT3-ITD bei ED .....</i>	<i>50</i>

## **XI. DANKSAGUNG**

Mein ganz besonderer Dank geht an Herrn Prof. Dr. med. Karsten Spiekermann und Frau PD Dr. med. Friederike Pastore für die Themenstellung, die hervorragende Betreuung während der Arbeit, sowie die Möglichkeit einen Beitrag zur Forschung der AML zu leisten und an Publikationen mitzuwirken.

Vielen Dank geht an das gesamte Team der LfL für die tolle Zusammenarbeit und die genetischen Analysen, die so schnell und hervorragend durchgeführt wurden. Ein spezieller Dank geht an Frau Dr. rer. nat. Stephanie Schneider, die mich bei genetischen Fragestellungen hervorragend beraten hat.

Vielmals möchte ich auch meinen Eltern danken, die mir das Studium ermöglicht haben und mich in allen Lebenslagen unterstützt haben, um alle meine Ziele zu erreichen.

Besonders danken möchte ich meinem Mann Johannes, der mir nicht nur technische und statistische Hilfestellung geliefert hat, sondern auch für die moralische und emotionale Unterstützung, ohne die diese Arbeit nicht möglich gewesen wäre.

## Eidesstattliche Versicherung

**Schumacher, Daniela**

---

Name, Vorname

Ich erkläre hiermit an Eides statt,

dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Thema

**Genetische Stabilität und Prognose von AML Rezidiven am Klinikum Großhadern von 1999-2013**

selbständig verfasst, mich außer der angegebenen keiner weiteren Hilfsmittel bedient und alle Erkenntnisse, die aus dem Schrifttum ganz oder annähernd übernommen sind, als solche kenntlich gemacht und nach ihrer Herkunft unter Bezeichnung der Fundstelle einzeln nachgewiesen habe.

Ich erkläre des Weiteren, dass die hier vorgelegte Dissertation nicht in gleicher oder in ähnlicher Form bei einer anderen Stelle zur Erlangung eines akademischen Grades eingereicht wurde.

**Neuried, 28.02.2018**

---

Ort, Datum

**Daniela Schumacher**

---

Unterschrift Doktorandin/Doktorand